



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

BRUNHELD MAIA DUTRA

**EFEITO IMUNOMODULADOR DE CXCL10 EM CAMUNDONGOS BALB/C
INFECTADOS COM CEPA DE *Leishmania braziliensis* REFRACTÁRIA AO
TRATAMENTO COM ANTIMÔNIO**

FORTALEZA

2015

BRUNHELD MAIA DUTRA

**EFEITO IMUNOMODULADOR DE CXCL10 EM CAMUNDONGOS BALB/C
INFECTADOS COM CEPA DE *Leishmania braziliensis* REFRACTÁRIA AO
TRATAMENTO COM ANTIMÔNIO**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Jania Teixeira

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- D974e Dutra, Brunheld Maia.
Efeito imunomodulador de CXCL10 em camundongos BALB/c infectados com cepa de *Leishmania braziliensis* refratária ao tratamento com antimônio/ Brunheld Maia Dutra. – Fortaleza, 2015.
76 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-graduação em Patologia, Fortaleza, 2015.
Orientação: Profa. Dra. Maria Jania Teixeira.
1. *Leishmania braziliensis*. 2. Resistência a Medicamentos. 3. Camundongos Endogâmicos BALB C. 4. Quimiocina CXCL10. I. Título.

CDD 616.9364

BRUNHELD MAIA DUTRA

**EFEITO IMUNOMODULADOR DE CXCL10 EM CAMUNDONGOS BALB/C
INFECTADOS COM CEPA DE *Leishmania braziliensis* REFRACTÁRIA AO
TRATAMENTO COM ANTIMÔNIO**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Jania Teixeira (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Regis Bernardo Brandim Gomes
FIOCRUZ-Piauí

Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira
Universidade Federal do Ceará

Aos meus pais, **Sebastião Siqueira Dutra** e **Maria Auxiliadora Maia de Oliveira**, pela dedicação e pelo amor incondicional.

Aos meus irmãos **Michelangelo Maia Dutra**, **Marianne Maia Dutra Balsells**, **Tiago Maia Dutra (in memoriam)** e **Gabriela Maia Dutra** pelo companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Jania Teixeira, por este trabalho e pela excelente orientação e ajuda inestimável, alguém que leva seus alunos ao crescimento profissional, com carinho e atenção sem tamanhos, fazendo com que tenhamos prazer e amor pelo trabalho que desenvolvemos, sendo um espelho para um futuro exercício da profissão.

À Profa. Dra. Cristina de Souza Chaves, chefe do Setor de Estudos em Parasitologia, no DPML, pela oportunidade de trabalhar no laboratório.

À agência de fomento à pesquisa CNPq, pelo apoio financeiro, para a realização dessa dissertação, através de bolsa para estudante de mestrado.

À Coordenação do Mestrado em Patologia/UFC pelo auxílio e presteza, ao longo de meus dois anos de curso, e especialmente às secretarias Paula da Paz Palácio e Valéria Cordeiro de Oliveira, pela disponibilidade e eficiência na resolução de todos os assuntos administrativos.

Aos professores do Mestrado, pelo conhecimento e experiência transmitidos.

Aos colegas da turma de mestrado, que ingressaram juntamente comigo no curso de pós-graduação em Patologia, em 2013.1, pelos momentos compartilhados ao longo desses dois anos.

A todos do Setor de Estudos em Parasitologia do DPML/UFC; professores, mestrandos, graduandos e funcionários, que contribuíram de forma direta ou indireta com este trabalho. Um agradecimento especial à Lucineide Bastos e aos amigos do laboratório Naya Rodrigues, Weberty Figueiredo, Allan Rodrigo Soares Maia, Priscila Valera Guerra, João Victor Serra Nunes, Sayonara de Melo, Brunna Nery, Francisco Rafael Marciano Fonseca, Claudênia Costa Praciano, Thially Braga Gonçalves e Rafaelle de Paula Freire, pelo valioso auxílio sempre que necessário, e pelo companheirismo na convivência diária do laboratório.

À toda minha família, em especial aos meus queridos pais, Sebastião Siqueira Dutra e Maria Auxiliadora Maia de Oliveira e irmãos Marianne Maia Dutra Ballsels, Gabriela Maia Dutra, Michelângelo Maia Dutra, que são meus grandes amigos e companheiros, que Deus permitiu serem meus laços sanguíneos mais próximos, que me conduzem e torcem verdadeiramente para o caminho do bem; os quais possuo um agradecimento eterno pelos ensinamentos de uma vida inteira, e um amor incondicional, que não precisa de um espaço físico ou geográfico para existir.

Ao Cláudio Costa Ballsels, à minha irmã Marianne Maia Dutra Ballsels e meu sobrinho Mateus Dutra Ballsels, por terem me acolhido em um lar com tanto carinho e apoio, permitindo assim que hoje eu possa estar obtendo mais essa conquista, e por ser minha referência de família durante esses dois anos.

Às amigas Danielle Alves e Amanda Holanda, que são irmãs que a vida me presenteou, que me faz agradecer todos os dias por tê-las, pelas quais tenho amor, consideração e ligação para muito além deste plano.

À meus grandes amigos Livia Coelho de Assis e Robson Carlos de Araújo pelo apoio, amizade, companheirismo sempre, muito obrigada, são amigos que levo para uma vida toda.

À Maria Rita Costa Ballsels e Freddy Barreiro Ballsels (*in memoriam*) por serem amigos e família, colaborando com tanta disposição e alegria, conselhos, incentivando todos os momentos e trazendo sempre energias positivas.

Às minhas especiais amigas de jornada do Mestrado Naya Castro e Kélvia Miranda, que fizeram meus dias mais leves e me ajudaram em todos os momentos que precisei, e que vou levar no meu coração.

A Deus, por essa existência e os desafios e bênçãos.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.

(Albert Einstein).

RESUMO

Leishmania braziliensis proveniente de paciente resistente ao antimônio é capaz de induzir altos níveis de IL-4 e de Arginase em camundongos, contribuindo para a maior virulência da cepa e gravidade da doença. CXCL10 é uma quimiocina que recruta e ativa células Th1, NK, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. O objetivo deste trabalho foi avaliar in vivo o efeito de CXCL10 na infecção por cepa de *L. braziliensis* refratária ao tratamento com antimônio. Camundongos BALB/c (n=64) foram infectados por via intradérmica na orelha direita, 10^7 promastigotas (20 μ L) e após o aparecimento das lesões (5^a sem), os animais foram divididos em quatro grupos (16 animais/grupo): 1. Controle não tratado; 2. Glucantime (100mg/kg/dia, I.M.); 3. CXCL10 (100ng/10 μ L, I.M.); 4. Glucantime+CXCL10 (100ng/10 μ L + 100mg/kg/dia, I.M.). Os animais foram tratados por 7 dias, acompanhados com medidas semanais das lesões e eutanasiados na 1^a e 3^a semanas pós-tratamento (s.p.t.) para a avaliação de alguns parâmetros: carga parasitária (lesões e linfonodo de drenagem-LN), produção das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-10 e TGF- β (linfonodo) e alterações histológicas (lesões). Os resultados mostraram que CXCL10 e CXCL10+Glucantime induziram, já a partir da 1^a s.p.t, lesões não ulceradas e que regrediram significativamente ($0,35\pm 0,07$; $0,047\pm 0,27$; $p<0,05$), quando comparado ao Controle ($0,63\pm 0,12$) e ao Glucantime ($0,56\pm 0,12$). Isso foi relacionado com a importante diminuição da carga parasitária observada nos grupos CXCL10 e CXCL10+Glucantime, no LN ($1,17\times 10^3 \pm 0,85 \times 10^3$; $2,05\times 10^3 \pm 1,50\times 10^3$, respectivamente) quando comparado ao Controle ($3,2\times 10^4 \pm 1,97\times 10^4$) e ao Glucantime ($1,18\times 10^5 \pm 1,12\times 10^5$). Em relação às citocinas, o tratamento com CXCL10 mostrou altas concentrações de IFN- γ , IL-10 e TGF- β , e baixa produção de IL-4. Em contrapartida, nos grupos Controle e Glucantime, foi observada maior produção de IL-4. Esses dados corroboram também com os achados histopatológicos que mostraram que os animais tratados com CXCL10, associado ou não ao Glucantime, apresentaram uma inflamação não exacerbada, com ausência de necrose, menor parasitismo, presença de granulomas e infiltrado celular com mais macrófagos ativados, muitos linfócitos e poucos plasmócitos, em relação ao Controle e ao Glucantime. Em suma, CXCL10 e a associação CXCL10+Glucantime induziram lesões menores, não ulceradas, com diminuição da carga parasitária mais precocemente, conduzindo à resolução da doença através de uma resposta imunológica com alta produção de IFN- γ e baixa produção de IL-4, e controle da inflamação modulado por IL-10 e TGF- β .

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*. Resistência a Medicamentos. Camundongos Endogâmicos BALB C. Quimiocina CXCL10.

ABSTRACT

Leishmania braziliensis from antimony-resistant patient is able to induce high levels of IL-4 and Arginase in mice, contributing to the increased virulence of the strain and the severity of the disease. CXCL10 is a chemokine that recruits and activates Th1 cells, NK, macrophages, dendritic cells and lymphocytes B. The objective of this study was to evaluate in vivo the effect of CXCL10 in the infection by strain of *L. braziliensis* refractory to treatment with antimony. BALB/c mice (n=64) were infected intradermally in the right ear 10^7 promastigotes (20 μ l), and after appearance of lesions (5^a week), the animals were divided into four groups (16/group): 1. Control untreated; 2. Glucantime (100mg/kg/day, I.M.); 3. CXCL10 (100 ng/10 μ L, I.M.); 4. Glucantime+CXCL10 (100ng/10 μ L+100mg/kg/day, I.M.). The animals were treated for 7 days, followed by weekly measurements of lesions, and were euthanized in the first and fourth week post-treatment (w.p.t) for the evaluation of some parameters: parasite burden (lesions, and draining lymph node-LN), production of the cytokines IFN- γ , IL-4, IL-10 and TGF- β (LN) and histological changes (lesions). The results showed CXCL10 and Glucantime induced, early as the first s.p.t., non-ulcerated lesions that regressed significantly (0.35 ± 0.07 , 0.047 ± 0.27 , $p < 0.05$) compared to controls (0.63 ± 0.12) and Glucantime (0.56 ± 0.12). This was associated with a significant decrease in parasite load observed in CXCL10 and CXCL10 + Glucantime groups, in the lymph node ($1.17 \times 10^3 \pm 0.85 \times 10^3$, $2.05 \times 10^3 \pm 1.50 \times 10^3$, respectively) compared to control ($3.2 \times 10^4 \pm 1.97 \times 10^4$) and Glucantime ($1.18 \times 10^5 \pm 1.12 \times 10^5$). Regarding to cytokines, CXCL10 treated animals showed high levels of IFN- γ , IL-10 and TGF- β , and low IL-4 production. In contrast, was observed in the control and Glucantime groups increased production of IL-4. These data also corroborate the histopathological findings showing that animals treated with CXCL10, with or without Glucantime, showed a non-exacerbated inflammation, with absence of necrosis, lower parasitism, granulomas and cellular infiltrate with more activated macrophages, many lymphocytes and few plasma cells, compared to control and Glucantime. In conclusion, CXCL10 and the association CXCL10+Glucantime induced minor injuries, lesions non-ulcerated, with decreased earlier parasite load, leading to the resolution of the disease through an immune response with high IFN- γ and low IL-4 production, and with the control of inflammation mediated by IL-10 and TGF- β .

Keywords: *Leishmania braziliensis*. Drug Resistance. Inbred BALB C Mice. Chemokine CXCL10.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Ciclo de vida de *Leishmania spp.* (A) e as formas evolutivas promastigotas (B) e amastigotas (C) 16
- Figura 2** – Mecanismos que influenciam a expansão de diferentes subpopulações de células T CD4⁺ como parte da resposta imunológica adaptativa à infecção por *Leishmania major* 24
- Figura 3** – Imagem macroscópica do linfonodo de drenagem da lesão em camundongos BALB/c infectados na derme da orelha direita com *Leishmania braziliensis* LTCP393 (resistente ao antimônio) 38
- Figura 4** – Aspectos macroscópicos da orelha de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* refratária a antimônio e tratados com CXCL10 43
- Gráfico 1** – Efeito de CXCL10 no desenvolvimento das lesões em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* resistente ao antimônio 42
- Gráfico 2** – Carga parasitária na lesão (A) e no linfonodo de drenagem da lesão (B) em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* resistente ao antimônio e tratados com CXCL10 45
- Gráfico 3** – Parâmetros inflamatórios na lesão de orelha em camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* refratária ao antimônio e tratados com CXCL10 47
- Gráfico 4** – Exudato celular na lesão de orelha em camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* refratária ao antimônio e tratados com CXCL10 49
- Gráfico 5** – Produção de citocinas IFN- γ (A), IL-10 (B), IL-4 (C) e TGF- β (D) no linfonodo de drenagem da lesão de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* refratária ao antimônio e tratados com CXCL10 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	Célula dendrítica
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EP	Erro padrão
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzida
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LD	Leishmaniose disseminada
LCM	Leishmaniose cutâneo-mucosa
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
MIP-1 β	Proteína inflamatória de macrófagos 1 beta
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MS	Ministério da Saúde
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
OMS/WHO	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
PMN	Polimorfonucleares
PGE2	Prostaglandina E2
SBF	Soro bovino fetal
SVS/MS	Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde
TGF- β	Fator de transformação do crescimento β
Th	<i>T helper</i> (T auxiliar)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Epidemiologia	Erro! Indicador não definido.
1.2 Agente etiológico e ciclo biológico	13
1.3 Manifestações clínicas com ênfase na leishmaniose tegumentar causada por <i>Leishmania braziliensis</i>	16
1.4 Aspectos imunológicos na infecção por <i>Leishmania</i>	19
1.5 Modelos de leishmaniose cutânea experimental com ênfase em <i>L. braziliensis</i>	25
1.6 Tratamento	27
1.7 Quimiocinas e seus receptores	29
1.8 Quimiocina CXCL10 na infecção por <i>Leishmania</i>	30
2. JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Desenho experimental	35
4.2 Reagentes e meios de cultura	35
4.3 Camundongos	36
4.4 Parasitos	36
4.5 Infecção dos camundongos, tratamento e acompanhamento da espessura das lesões	37
4.6 Determinação da carga parasitária	38
4.7 Cultura de células do linfonodo de drenagem e dosagem de citocinas	39
4.8 Quantificação de citocinas através de ELISA	39
4.9 Análise histopatológica das lesões	40
4.10 Análise estatística	40
5. RESULTADOS	41
5.1 Avaliação da cinética das lesões	41
5.2 Carga parasitária no sítio de inoculação do parasito (orelha) e linfonodo de drenagem da lesão	43
5.3 Avaliação da reação inflamatória na lesão de orelha de camundongos BALB/c	46
5.4 Dosagem de citocinas no linfonodo de drenagem da lesão	49
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO	60

REFERÊNCIAS	61
APÊNDICE I.....	73
APÊNDICE II.....	74
ANEXO I.....	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

As leishmanioses são endêmicas em 98 países, três territórios e cinco continentes, e são consideradas uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades (ALVAR *et al.*, 2012; MS/SVS, 2013; LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que existem 12 milhões de infectados, 350 milhões de pessoas expostas ao risco de contrair a doença e cerca de 2 milhões de novos casos ocorrendo a cada ano (WHO/OMS, 2010).

Aproximadamente 200 a 400 mil pessoas são infectadas com LV por ano (WERNECK, 2014), com mais de 90% dos casos ocorrendo na Índia, Brasil, Nepal, Etiópia, Sudão e Bangladesh (MALLA; MAHAJAN, 2006; GOTO; PRIANTI, 2009; PACE, 2014), estando nessas regiões 90% dos casos fatais da doença (PIGOTT *et al.*, 2014). Além disso, é estimada a ocorrência de 50 mil mortes da forma visceral da doença por ano, uma taxa só superada pela malária (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014).

Para a Leishmaniose Cutânea (LC), estima-se a ocorrência de 0,7-1,2 milhões de novos casos por ano, principalmente no litoral do Mediterrâneo, nas Américas e Ásia (PACE, 2014). Cerca de dois terços desses casos estão presentes nos países: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil e Irã (WHO/OMS, 2014).

No Brasil, a LTA apresentou um aumento no número de casos registrados, a partir da década de 80, quando em 1985 se solidificou a implantação das ações de vigilância e controle da doença no país. Encontra-se presente em 19 unidades federativas, verificando-se sua expansão geográfica, quando em 2003 foi confirmada a autoctonia em todos os estados brasileiros. No período de 1985 a 2005, verificaram-se uma média anual de 28.568 casos autóctones registrados e coeficiente de detecção médio de 18,5 casos/100.000 habitantes (MS/SVS, 2013).

No Estado do Ceará, a LTA representa um importante problema de saúde pública, apresentando elevados índices. De acordo com o Ministério da Saúde, o Ceará está entre as três regiões de maior detecção da doença no Nordeste, com 514 casos em 2013, com coeficiente de detecção 5,9 por 100.000 habitantes, estando atrás apenas da Bahia e do Maranhão (MS, 2014).

1.2 Agente etiológico e ciclo biológico

As leishmanioses são infecções causadas por protozoários tripanossomatídeos pertencentes à ordem Kinetoplastida do gênero *Leishmania* (ALMEIDA; BARRAL; BARRAL-NETO, 2003; PACE, 2014). Esses protozoários compreendem mais de 30 espécies, das quais 11 têm significativa importância médica e veterinária (CECÍLIO *et al.*, 2014). O gênero *Leishmania* é classificado em dois subgêneros: *Viannia*, com prevalência apenas no Novo Mundo (Américas), e *Leishmania*, sendo as regiões geográficas de ocorrência o Velho Mundo (Europa, Ásia e África) e Novo Mundo (PACE, 2014). A doença pode se manifestar sob as formas clínicas: cutânea, mucocutânea e visceral, dependendo da espécie do parasito (HARHAY *et al.*, 2011, ABDELLATIF; EL-MABROUK; EWIS, 2013).

As leishmânias possuem um ciclo de vida digenético, exigindo um hospedeiro vertebrado e um inseto vetor, sendo capazes de infectar animais, seres humanos e os seus vetores, os flebotomíneos (PISCOPO; AZZOPARDI, 2006; GIUDICE *et al.*, 2007; CECÍLIO *et al.*, 2014).

Os dípteros, da subfamília *Phlebotominae*, são os vetores de várias espécies de *Leishmania* considerando-se as 93 espécies envolvidas na transmissão (WHO/OMS, 2010; ALMEIDA; BARRAL; BARRAL-NETO, 2003; CHAARA *et al.*, 2014). A infecção ocorre por dois principais gêneros: *Phlebotomus*, no Velho Mundo e *Lutzomyia*, no Novo Mundo (BEZERRA; TEIXEIRA, 2001; PISCOPO; AZZOPARDI, 2006; ABDELLATIF; EL-MABROUK; EWIS, 2013). Os hospedeiros vertebrados incluem cerca de 60 espécies de reservatórios mamíferos como cães, roedores, edentados, marsupiais e o homem (MCGWIRE; SATOSKAR, 2013; WHO/OMS, 2010; CHAARA *et al.*, 2014).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) foi primeiramente confirmada no Brasil em 1909, pelos achados do parasito em indivíduos com úlceras cutâneas e nasobucofaríngeas (MS/SVS, 2013). É uma doença de caráter zoonótico, que acomete o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos, amplamente difundida na maioria dos países da América Latina, e causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

No Brasil, já foram identificadas sete espécies responsáveis pela transmissão da LTA, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonenses* (GIUDICE *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2010; SVS/MS, 2013). Mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*,

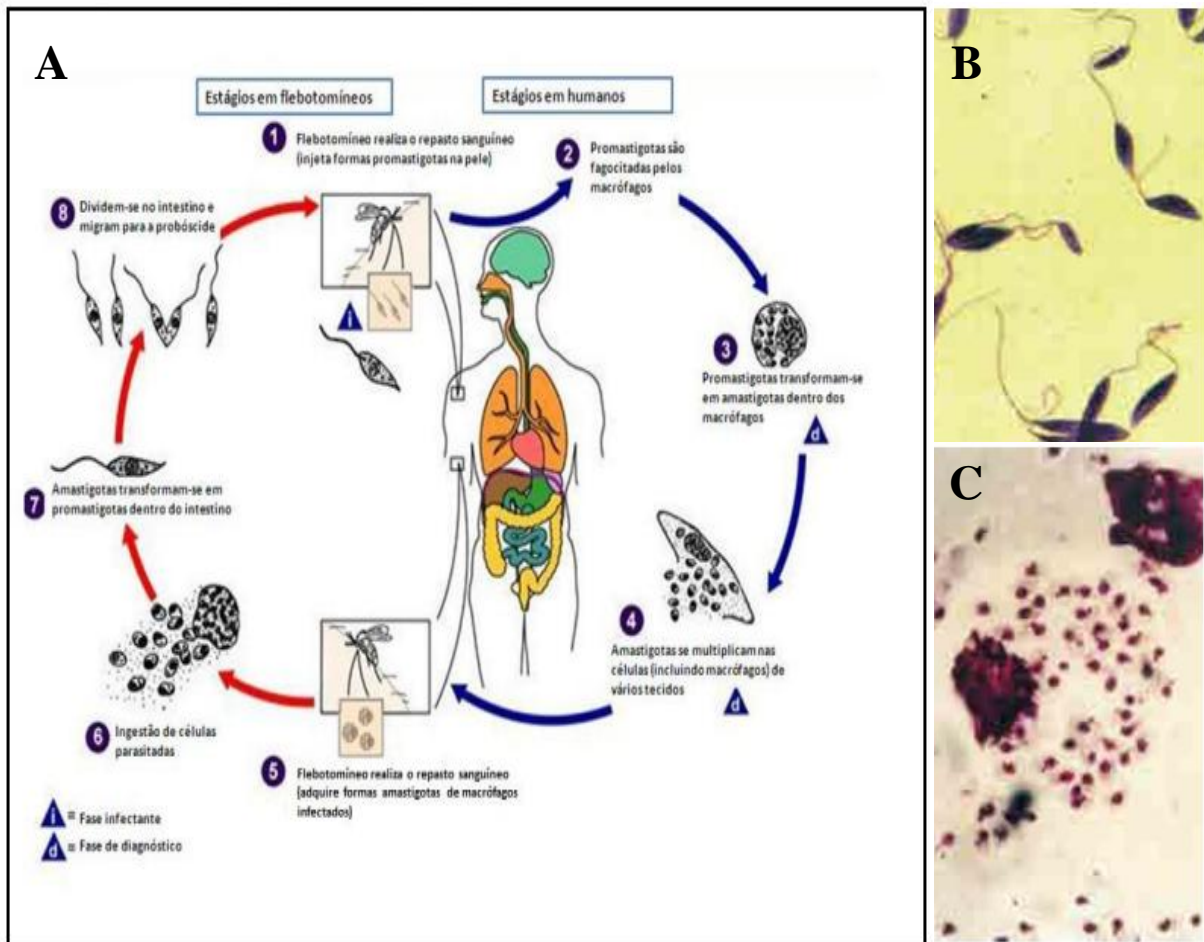
L. (V.) naiffi, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas como apresentando ocorrência em estados das regiões Norte e Nordeste (MS/SVS, 2013).

Nas regiões endêmicas para LTA no Brasil, e especialmente no Ceará, o agente etiológico principal é a espécie *L. braziliensis* (VASCONCELOS *et al.*, 1988; DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012). A transmissão está associada aos flebotomíneos *Lutzomyia whitmani*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcomei*, *Lu. flaviscutellata*, *Lu. umbratilis* e *Lu. migonei*, sendo *Lu. whitmani* o mais importante vetor natural de *L. braziliensis* no Ceará (BEZERRA; TEIXEIRA, 2001; DE OLIVEIRA E BRODSKYN, 2012; SVS/MS, 2013).

Os parasitos ocorrem sob duas formas evolutivas importantes: promastigota e amastigota. As promastigotas são extracelulares flageladas, medindo de 15-20 µm e são encontradas no trato digestivo dos vetores flebotomíneos (MALLA; MAHAJAN, 2006; GIUDICE *et al.*, 2007; KIMBLIN *et al.*, 2008; PACE, 2014). Por outro lado, as amastigotas medem 3-5µm, e são caracterizadas por serem obrigatoriamente intracelulares e sem flagelo externo, localizadas em células da linhagem fagocítica mononuclear dos hospedeiros vertebrados (BEZERRA *et al.*, 1996; ALEXANDER; BROMBACHER, 2012; GIUDICE *et al.*, 2007; PACE, 2014).

No trato digestivo das fêmeas dos flebotomíneos, a forma promastigota procíclica se liga à parede do intestino do inseto, sofrendo várias mudanças (metacicloênese), culminando na forma infecciosa do parasito de *Leishmania*, promastigota metacíclica. Nessa fase, perde a capacidade de se fixar ao intestino médio e migra para a região da probóscida. A infecção ocorre quando, durante os hábitos hematófagos do inseto, as formas infectantes do parasito, de 1 a 1000 metacíclicas, são liberadas na derme do hospedeiro mamífero (ALMEIDA; BARRAL; BARRAL-NETO, 2003; KIMBLIN *et al.*, 2008). Em seguida, os parasitos são rapidamente captados por células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), dentro dos fagolisossomos. No interior dos macrófagos as promastigotas se diferenciam na forma amastigota, se multiplicam por divisão binária e infectam outros tecidos. O ciclo é concluído quando o flebotomíneo torna a se alimentar de sangue de hospedeiros vertebrados infectados, adquirindo as formas amastigotas (CECÍLIO *et al.*, 2014) (Figura 1).

Figura 1 – Ciclo de vida de *Leishmania spp.* (A) e as formas evolutivas promastigotas (B) e amastigotas (C).



Fonte: Adaptado do Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2014.

1.3 Manifestações clínicas com ênfase na leishmaniose tegumentar causada por *Leishmania braziliensis*

As leishmanioses podem se manifestar sob as formas: visceral e tegumentares, ocorrendo desde casos assintomáticos a sintomáticos, com diferentes graus de susceptibilidade à infecção (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; PISCOPO; AZZOPARDI, 2006).

A leishmaniose visceral (LV) resulta da infecção dos fagócitos dentro do sistema retículo-endotelial (MCGWIRE; SATOSKAR, 2013). Tanto o período de incubação, quanto a manifestação da doença é variável, podendo ocorrer nos primeiros 10 dias após exposição até mais de um ano após a infecção (MALLA; MAHAJAN, 2006). Os sintomas são devido à

disseminação dos parasitos de *Leishmania*, que induzem acumulação de células fagocíticas mononucleares dentro dos órgãos invadidos, ocasionando hiperplasia das células reticuloendoteliais, implicando nas manifestações clínicas como esplenomegalia, hepatomegalia, seguido dos sintomas palidez, febre, anorexia, perda de peso e distensão abdominal (GOTO; PRIANTI, 2009). Os sintomas podem ser fatais se a doença não for tratada e agravado devido à faixa etária do indivíduo infectado, ocorrendo maior gravidade em crianças (PISCOPO; AZZOPARDI, 2006; PACE, 2014).

Na maioria dos casos de LTA, a lesão cutânea inicial evolui para a ulceração superficial e, posteriormente, para uma lesão clássica de úlcera profunda, com bordas elevadas (DA-CRUZ *et al.*, 2002). A LTA pode apresentar quatro manifestações clínicas diferentes da doença: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea mucosa (LCM), e leishmaniose disseminada (LD), causadas frequentemente por *L. (V.) braziliensis* no Nordeste do Brasil; e leishmaniose cutânea difusa (LCD) causada por *L. amazonensis* (CARVALHO; PASSOS; JESUS, 2005; SOUZA *et al.*, 2010).

O espectro clínico das LTA depende de interações complexas que abrangem parasitos e hospedeiros, tais como: a espécie de *Leishmania*, sua capacidade infectiva e o estado imunológico e nutricional do hospedeiro, o que leva também às respostas diferenciadas ao tratamento (ALEXANDRE; SATOSKAR; RUSSEL, 1999).

A leishmaniose cutânea localizada (LCL) possui um período de incubação variando de 2 a 8 semanas e se inicia com uma pápula no local da picada do flebotomíneo (PISCOPO; AZZOPARDI, 2006). Momentos seguintes ocorrem típicas lesões simples e únicas, com úlceras de bordas elevadas e fundo granuloso (CARVALHO; PASSOS; JESUS, 2005). Nesse tipo de infecção a resposta celular é caracterizada por células do tipo TCD4+ e TCD8+, com a presença de alguns macrófagos e parasitos (FARIAS *et al.*, 2012).

Os pacientes com LCL apresentam teste de Montenegro positivo, alta resposta linfoproliferativa para antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) e altos níveis de IFN- γ , TNF- α , e baixos níveis de IL-10 (BACELLAR *et al.*, 2002). Nessa clínica temos ainda altos níveis para citocina IL-12, porém, menor produção de IL-4 (TULADHAR; NATARAJAN; SATOSKAR, 2011). Nesses pacientes, IFN- γ é produzido por linfócitos T CD4+ e CD8+ (ANTONELLI *et al.*, 2004). O perfil de citocinas encontradas em biópsias de pele de pacientes com LCL demonstram alta expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e TNF- α (QADOUMI *et al.*, 2002).

Na leishmaniose cutânea mucosa (LCM), também conhecida como espúndia, o período de incubação varia de 1 a 3 meses, e são observadas múltiplas lesões ulceradas, no qual pode haver, principalmente, o comprometimento das mucosas da orofaringe, com destruição do palato, faringe, laringe, septo nasal e o aparecimento de lesões desfigurantes (PISCOPO; AZZOPARDI, 2006). A resposta celular se apresenta de forma exacerbada, com predominância de TCD4+ (FARIAS *et al.*, 2012). A disseminação linfática ou hematogênica de *L. braziliensis*, meses ou anos após uma lesão cutânea, pode ocasionar essa forma clínica (SOUZA *et al.*, 2010). Estudos corroboram com a ideia de que, enquanto a maioria das espécies de *Leishmania* causam lesões estritas a pequenas áreas da pele, *L. braziliensis* causa lesões difusas que podem se espalhar para os tecidos das mucosas conduzindo ao quadro de LCM (CECÍLIO *et al.*, 2014).

A forma LCM apresenta uma resposta imunológica mais exacerbada e não regulada em relação à LCL, devido à relação entre citocinas pró e anti- inflamatórias, uma vez que a LCL apresenta uma correlação mais positiva entre IL-10 e TNF- α em relação à LCM, uma vez que na forma LCM são encontrados menos receptores para IL-10 (DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012).

L. braziliensis pode causar ainda a forma disseminada (LD), relativamente rara, geralmente em pacientes imunossuprimidos, descrita pela ocorrência de inúmeras lesões acneiformes pleomórficas, envolvendo principalmente face e tronco, podendo ser papulares ou nodulares, em duas ou mais áreas do corpo não contíguas (SOUSA *et al.*, 2006). Na resposta imunológica é observada uma produção mais baixa de IFN- γ e TNF- α por células mononucleares, após estímulo com antígeno solúvel do parasito, quando comparada à LCL (CARVALHO; PASSOS; JESUS, 2005).

Estudos demonstram que 10% dos indivíduos residentes em áreas endêmicas infectados com *L. braziliensis* são classificados como formas subclínicas, caracterizadas por uma resposta imunológica de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH), no qual ocorre resposta contra os antígenos de *Leishmania*, porém não exibem nenhuma lesão (FOLLADOR *et al.*, 2002). Esses indivíduos apresentam as respostas imunes celulares do tipo Th1 menos intensas quando comparadas com LC ou LCM, e menor produção de IFN- γ e TNF- α (DA SILVA SANTOS; BRODSKYN, 2014). Desta forma, observa-se que a resposta Th1 pode ser eficaz se modulada, conduzindo à proteção contra o parasito, sem induzir inflamação tecidual (CARVALHO; PASSOS; JESUS, 2005).

1.4 Aspectos imunológicos na infecção por *Leishmania*

Na infecção por *Leishmania spp.*, a resposta imunológica protetora é mediada predominantemente por células (SCOTT *et al.*, 1988; CARVALHO; PASSOS; JESUS, 2005). A diferenciação das distintas subpopulações de células TCD4⁺ (Th1, Th2, Th17 e células T regulatórias) direciona para diferentes tipos de resposta imunológica (FOWELL, 2009).

No início da infecção, as promastigotas metacíclicas, que são inoculadas pelos flebotomíneos, são reconhecidas e capturadas por neutrófilos, células dendríticas (CDs) e também macrófagos (Mφ), sua célula hospedeira natural, passando à forma amastigota (TULADHAR; NATARAJAN; SATOSKAR, 2011).

No momento inicial da infecção, o maxidilan, um peptídeo salivar presente nos flebotomíneos, auxilia no repasto sanguíneo e na inoculação das formas de *Leishmania*, por aumentar o fluxo sanguíneo, a vasodilatação e inibir a coagulação sanguínea e a agregação de plaquetas, além de afetar a hemostasia local e impedir a produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos, suprimindo sua atividade leishmanicida e exacerbando o desenvolvimento das lesões (BOZZA *et al.*, 1998; ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999).

Na infecção por *L. braziliensis*, o desenvolvimento de lesões e a resposta imunológica coincidem com o influxo de células inflamatórias, como macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (VON STEBUT, 2007; NOVAIS *et al.*, 2009). No processo infeccioso ocorrem particularidades como cronicidade, latência e tendência à metástase em seres humanos (DE MOURA *et al.*, 2007; NOVAIS *et al.*, 2009).

Os neutrófilos estão entre as primeiras células com ação fagocítica no infiltrado celular, permanecendo cerca de dois dias após a infecção (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004; NOVAIS *et al.*, 2009). Fornecem a primeira linha de defesa, liberam mediadores que alteram o ambiente extracelular e recrutam células inflamatórias (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004). Sua atividade está ligada ao processo de fagocitose, seguida de morte celular programada, e expressão de fosfatidilserina (PS) por esses corpos apoptóticos (CECÍLIO *et al.*, 2014). Estes, por sua vez, são englobados pelos macrófagos, que além de estimular o processo da resposta imunológica promovem um ambiente que favorece o estabelecimento da infecção (DA SILVA SANTOS; BRODSKYN, 2014).

Estudos demonstram que neutrófilos infectados com *L. major* secretam altos níveis da quimiocina MIP-1β (proteína inflamatória de macrófagos 1 beta), que atrai macrófagos e induz a produção da citocina anti-inflamatória fator de transformação do

crescimento β (TGF- β), demonstrando que os neutrófilos podem ser células utilizadas pela *Leishmania* para entrar silenciosamente em macrófagos, sua célula hospedeira (VON STEBUT, 2007). Outros estudos que investigaram o papel dos neutrófilos na ativação de macrófagos relatam ainda que na infecção de camundongos BALB/c com *L. major*, a morte de neutrófilos exacerba a infecção através da ação de PGE2 (prostaglandina E2) e TGF- β , que são produzidos por macrófagos infectados (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004). Outros trabalhos mostram ainda, que macrófagos infectados com *L. amazonensis* na presença de neutrófilos apoptóticos produzem TGF- β e PGE2 conduzindo a replicação do parasito (DA SILVA SANTOS; BRODSKYN, 2014).

Outro grupo do sistema imunológico inato, que atua nos eventos iniciais após a infecção, são os componentes do sistema complemento, C3a e C5a, que atuam como quimioatrativos para células inflamatórias, como monócitos/macrófagos e neutrófilos. C3b possui função de opsonização das formas metacíclicas, ativação das vias clássicas e alternativas, com consequente formação do complexo de ataque à membrana (C5b-C9), culminando na morte do parasito nos primeiros minutos pós-infecção. Parasitos de *Leishmania* evoluíram para mecanismos que evitam a lise pelo sistema complemento levando a inibição dessa resposta inata (VON STEBUT, 2007).

Fatores de virulência presentes nas formas promastigotas participam da etiopatogenia da infecção. Ao contrário das amastigostas, as promastigostas expressam altas taxas de glicoconjugados em sua superfície, tais como lipofosfoglicanos (LPG) e metaloproteases gp63, com função de proteger contra enzimas hidrolíticas presentes no intestino dos flebotomíneos. Formas metacíclicas de *L. donovani* e *L. major* expressam alta quantidade de LPG, promovem a não permanência na sua superfície do complexo de ataque à membrana C5-C9, permitindo que a promastigota metacíclica suporte a ativação do complemento e possa infectar macrófagos com sucesso. Além disso, a síntese de gp63 na superfície das metacíclicas pode levar à clivagem de C3b para C3bi, e estas opsoninas fazem com que o parasito de *Leishmania* possa ser reconhecido pelos receptores CR1 e CR3, presentes nos macrófagos, levando a uma invasão considerada silenciosa, além de evitar a deposição lítica de C5b-C9 (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999; SACKS; SHER, 2002; VON STEBUT, 2007).

O controle de inúmeros patógenos, incluindo infecções por protozoários, vírus, bactérias, fungos e helmintos, dependem da produção pelos fagócitos de espécies reativas de

oxigênio (ROIs) e de nitrogênio, sendo este responsável por produzir NO, a partir da enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS) (QADOUMI *et al.*, 2002).

Macrófagos parasitados produzem NO, ROIs e enzimas lisossomais, que são responsáveis pela morte do parasito (DA SILVA SANTOS; BRODSKYN, 2014; SACKS; SHER, 2002). A maior fonte de intermediários ROIs ocorre através da ação da enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), que catalisa a transferência de elétrons, a partir de NADPH, para moléculas de oxigênio, resultando na produção de superóxidos e peróxidos de hidrogênio, sendo fundamental nesse processo a atividade das proteínas cinase C (PKC) e tirosina cinase (PTKs), uma vez que a inibição dessas proteínas suprime a explosão oxidativa em macrófagos (SACKS; SHER, 2002).

Em infecções por *L. major* é observado que após a invasão dos macrófagos, ocorre a migração e a ativação de outras células do sistema imune inato, tais como: mastócitos residentes, neutrófilos e monócitos, fase na qual as lesões cutâneas se apresentam mais proeminentes (VON STEBUT, 2007).

Os macrófagos, que já se encontram parasitados, fazem parte do grupo de células apresentadoras de antígenos (APCs), que juntamente com CDs e células B promovem a resposta celular adaptativa mediada por linfócitos T. Porém, para uma resposta efetora bem sucedida, são necessários dois eventos cruciais: a apresentação e o reconhecimento do antígeno. Após a apresentação através das APCs, ocorre o reconhecimento dos péptidos antigênicos através de complexo principal de histocompatibilidade (MHC) via MHC II para o receptor de células T CD4+ *naïve*, seguido da expressão de co-estimuladores como CD40-CD40L, CD80/CD86-CD28, gerando subpopulações T CD4+ Th1, Th2, Th17, Th9 de acordo com as citocinas às quais os linfócitos são expostos (MOSMANN *et al.*, 1986; ALEXANDER; BRYSON, 2005; TULADHAR; NATARAJAN; SATOSKAR, 2011).

A imunidade protetora contra a infecção por *Leishmania* depende da produção de IL-12, por macrófagos e células dendríticas, a qual atua em células Th1 e NK (TRINCHIERI; GEROSA, 1996; ALEXANDER; BRYSON, 2005; CECÍLIO *et al.*, 2014). A diferenciação de TCD4⁺ em Th1 a partir de IL-12 ocorre através da transcrição do fator STAT-4, conduzindo a produção de IFN- γ por essas células (ALEXANDER; BROMBACHER, 2012). A citocina IFN- γ por sua vez irá ativar a função leishmanicida dos macrófagos, por meio da produção de NO, causando a morte dos parasitos intracelulares (AWASTHI; MATHUR, 2004; CECÍLIO *et al.*, 2014). A migração de CDs e células T coincide com a involução das lesões. A produção de IL-1 α/β , IL-27, IL-1, TNF- α , IL-23, IL-

18 também contribuem para a indução e manutenção de uma resposta Th1 protetora (ALEXANDER; BRYSON, 2005; VON STEBUT, 2007).

As células Th1 estão associadas à produção das citocinas IL-2, IFN- γ e TNF- α . Essa resposta é observada em camundongos C57BL/6 infectados por *L. major* (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Estudos relatam também que IFN- γ pode ativar macrófagos sozinho ou em sinergia com TNF- α , porém a produção de NO in vivo por macrófagos pode ocorrer independente de TNF- α , ressaltando IFN- γ como primordial na ação leishmanicida por macrófagos (AGUILAR-TORRENTERA; CARLIER, 2001).

A resposta Th2, observada na infecção de camundongos BALB/c por *L. major*, é caracterizada pelo predomínio de citocinas que podem desempenhar nessa infecção um perfil anti-inflamatório como IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, levando à sobrevivência do parasito e à evolução da doença (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Estudos propuseram que IL-4 e IL-13, que são citocinas da resposta imunológica do tipo Th2, podem ainda promover a produção de IL-12 por CDs e macrófagos, estimulando uma resposta Th1 e resistência à infecção (ALEXANDER; BROMBACHER, 2012). Porém, em camundongos BALB/c infectados com *L. major*, a produção de IL-4 por células TCD4⁺ expressando cadeias V β 4V α 8CD4 são condizentes à susceptibilidade e direcionamento à resposta Th2 e progressão da doença (MAILLARD *et al.*, 2001; LAUNOIS *et al.*, 2002).

Nas infecções por *Leishmania*, entre as citocinas que estão relacionadas à persistência da doença, destacam-se IL-10 e TGF- β . A primeira é produzida por diferentes tipos celulares, incluindo Treg, Th1, TCD8⁺, células B, NK, macrófagos e neutrófilos (BELKAID *et al.*, 2002; DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012). Por sua vez, TGF- β é produzido por macrófagos de camundongos infectados com *L. amazonenses* (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992) e por macrófagos humanos com *L. braziliensis*, *L. amazonenses* e *L. infantum* (BARRAL *et al.*, 1995). Ambas citocinas são importantes no estabelecimento da lesão.

A produção de TGF- β é importante para o reparo tecidual, mas em macrófagos pode promover o crescimento de patógenos intracelulares (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004). Sabe-se que a adição de TGF- β em culturas de macrófagos infectados com *L. braziliensis* promove aumento do número de parasitos em relação às culturas sem estimulação desta citocina (BARRAL *et al.*, 1995), e que a ativação de macrófagos por TGF- β proporciona um ambiente favorável à proliferação de *Leishmania* (DA SILVA SANTOS; BRODSKYN, 2014).

A citocina IL-10 é considerada pleiotrópica, com a propriedade de imunorregulação e ação anti-inflamatória, incluindo a supressão da ação de CDs e inativação de resposta por parte dos macrófagos (ANDERSON *et al.*, 2007). Estudos têm relatado que a produção de IL-10 por macrófagos ocorre através de amastigotas recobertas por moléculas de IgG que então promovem a ligação aos receptores Fc γ Rs presentes nos macrófagos, inibindo sua atividade e contribuindo para o crescimento do parasito nas lesões (KANE; MOSSER, 2001).

Outra subpopulação de células TCD4⁺ são as T regulatórias (Treg) com função efetora de imunorregulação (TALAAT *et al.*, 2015). Essas células são identificadas como dois principais subconjuntos: as naturais, consideradas as células Treg Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺, que ocorrem no hospedeiro antes da exposição ao patógeno e regulam células T reativas; e Treg induzidas, que se desenvolvem a partir de células T CD4⁺ convencionais, após a exposição a sinais como citocinas regulatórias ou APCs condicionadas por produtos microbianos. Todos os tipos de Treg têm a função de controlar a intensidade das respostas efetoras (BELKAID *et al.*, 2006). Contudo, mesmo quando células Treg conseguem exercer o papel e evitar uma resposta imunológica excessiva, podem ser observados efeitos colaterais como sobrevivência e persistência do parasito por longos períodos, demonstrando que esse também é um mecanismo de escape utilizado pelos patógenos (BELKAID, 2007).

Em modelo de infecção experimental por *L. major* em camundongos resistentes, os animais permanecem cronicamente infectados no sítio de infecção primária, onde células Treg CD4⁺CD25⁺ acumulam-se. Estas células regulam a função das células efetoras locais, a partir de mecanismos dependentes e independentes de IL-10 (BELKAID *et al.*, 2002). Em pacientes, verificou-se a presença de células Treg CD4⁺CD25⁺ em lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis*, com evidências de que essas células produziam IL-10 e TGF- β localmente (CAMPANELLI *et al.*, 2006). Em modelo de infecção de BALB/c por *L. braziliensis*, também verificaram o recrutamento de células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ para o sítio de inoculação do parasito (COSTA *et al.*, 2011, FALCÃO *et al.*, 2012).

As células B, um subgrupo de APCs, possuem um papel primordial na produção de imunoglobulinas do tipo IgG, com função de opsonização de amastigotas de *Leishmania* (KANE; MOSSER, 2001). A opsonização permite a ligação desse patógeno aos receptores Fc γ R presentes em vários tipos celulares. Os receptores para reconhecimento e fagocitose nos macrófagos são descritos como CR3, porém nas CDs essa função é dos receptores Fc γ e Fc γ RIII, capazes de se ligarem às amastigotas recobertas por IgG. Assim, camundongos sem

LTA ao antimônio e a não produção adequada de TNF- α por parte dos macrófagos, levando às formas mais severas da doença. Essa regulação negativa pode ocorrer pela indução de IL-10 e TGF- β pelo parasito, conduzindo a uma supressão de IFN- γ e TNF- α e desta forma, inibindo a função de NO nos macrófagos.

Adicionalmente a isso, um estudo recente mostrou que isolado de *L. braziliensis* proveniente de paciente resistente ao tratamento com antimônio foi capaz de induzir maior produção de IL-4 e de Arginase I em camundongos BALB/c infectados na derme da orelha, contribuindo para a maior virulência da cepa e gravidade da doença (COSTA *et al.*, 2011).

Essas características da resposta imunológica demonstram que o equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2, está condicionado a diferentes perfis de citocinas, que se fazem necessários no desenvolvimento de uma resposta efetora positiva. No entanto, apesar de fundamental à produção de citocinas reguladoras da resposta imunológica, estas mesmas, podem também estar associadas a um efeito de persistência da doença, sobrevivência do parasito, sugerindo que os mecanismos imunorreguladores podem levar ao desenvolvimento das imunopatologias *in vivo*.

1.5 Modelos de leishmaniose cutânea experimental com ênfase em *L. braziliensis*

Modelos experimentais com LC têm sido extensivamente utilizados nos últimos 40 anos para elucidar tipos celulares e produção de citocinas (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014). Outras pesquisas surgem com a finalidade de elucidar mecanismos efetores de respostas imunológicas, testes para novos tratamentos e caracterização de espécies de *Leishmania* (JUNIOR; MORIEARTY, 1983).

O fenótipo da doença pode ser reproduzido em laboratório, com a utilização de camundongos BALB/c, devido ao fato de serem animais geneticamente susceptíveis à infecção por *Leishmania* cutânea, podendo apresentar progressão da lesão e alta presença de parasitos no local de inoculação (KANE; MOSSER, 2001).

Além disso, a larga utilização de camundongos em pesquisas biomédicas deve-se à existência de grandes coleções de linhagens puras, que ao acasalarem geram animais geneticamente idênticos, sendo possível coletar dados mais precisos quando comparados às infecções em outros sistemas de mamíferos (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014).

Fatores como tamanho do inóculo, local da infecção e a espécie do parasito são importantes para o fenótipo da doença e a susceptibilidade versus resistência (BALDWIN *et al.*, 2003). A infecção de diferentes linhagens de camundongos com *L. major*, espécie causadora de LT no Velho Mundo, define claramente dois tipos de respostas: BALB/c apresentando susceptibilidade, implicado com a produção de citocinas relacionadas à resposta Th2, como IL-4, IL-10 e TGF- β (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014) associada à progressão da doença, e em contrapartida camundongos C57BL/6 que apresentam perfil de resistência, dependente da indução da resposta Th1, resultando na produção de IFN- γ , ativação de macrófagos, geração de NO e morte do parasito (AFONSO; SCOTT, 1993; KÉBAIER *et al.*, 2001; MAILLARD *et al.*, 2001; BALDWIN *et al.*, 2003).

A diferenciação das respostas Th1 e Th2 nas leishmanioses é dependente da espécie de *Leishmania* e de camundongos. Por exemplo, camundongos C3H/HeN infectados por *L. mexicana* ou C57BL/6 por *L. amazonensis* evoluem para cronicidade da doença, enquanto a infecção por *L. major* conduz à cura (AFONSO; SCOTT, 1993). Além disso, em modelo de infecção intradérmica na orelha por *L. braziliensis*, os camundongos BALB/c desenvolveram lesões ulceradas com cura espontânea, e foi observada uma resposta imunológica mista Th1/Th2, caracterizada pela presença de células secretoras de IFN- γ , IL-4 e IL-10, confirmando a ausência de dominância de resposta Th2 observada em infecções por *L. major* em animais susceptíveis (DE MOURA *et al.*, 2005).

A pesquisa experimental com *L. braziliensis* é consideravelmente menos extensa quando comparada aos estudos com *L. major*. Isso pode ser devido ao fato de que este parasito não é facilmente cultivado *in vitro* e ao fato de que a geração de promastigotas metacíclicas *in vitro* é ineficiente, tornando necessário o uso de inóculos grandes (10^6 - 10^7 parasitos) para que a infecção se estabeleça no camundongo (LIMA; DEKREY; TITUS, 1999).

Além disso, a maioria das cepas de camundongos é resistente à infecção por *L. braziliensis* (NEAL & HALE, 1983; CHILDS *et al.*, 1984). Na verdade, a infecção por *L. braziliensis* não leva ao desenvolvimento de uma resposta Th2 em camundongos BALB/c (DEKREY; LIMA; TITUS, 1998), ao contrário do que ocorre na infecção por *L. major*. Trabalhos mais recentes têm corroborado a relação de controle versus susceptibilidade ao parasito, atribuída às citocinas IFN- γ e IL-4, respectivamente, neste modelo. Observou-se que o tratamento com anti-IFN- γ em camundongos C57BL/6 infectados por *L. braziliensis* leva à

formação de lesões rápidas e progressivas, comprovando que a presença desta citocina é essencial no controle da infecção por esse parasito (ROCHA *et al.*, 2007; BOGDAN, 2007).

Contudo, essas não são as únicas citocinas envolvidas no cenário da infecção de BALB/c por *L. braziliensis*. A infecção leva a forte expressão de antígenos indutores de IL-12 (BORGES, 2001) e esta citocina, assim como IFN- γ , pode estar relacionada ao controle do parasito, visto que *L. braziliensis* induz apenas lesões pequenas e passageiras em camundongos BALB/c, em contraste com camundongos infectados por *L. major*, que apresentam úlceras progressivas. TNF- α também contribui para o controle do parasito durante a fase aguda da infecção, já que se observou que camundongos *knockout* para esta citocina e infectados por *L. brazilliensis* apresentaram número aumentado de parasitos em lesões, linfonodos e baço (ROCHA *et al.*, 2007).

Os camundongos BALB/c são os que demonstram serem os mais susceptíveis à infecção por *L. brazilliensis*. Nesse modelo, as lesões são autolimitadas, com desenvolvimento de lesões pequenas e não ulceradas quando inoculados na pata e ulceradas quando a infecção é feita na derme da orelha (DE MOURA *et al.*, 2005). Apesar de estudos mais extensos com modelos referentes à pata, autores apontam que BALB/c infectados na derme da orelha com *L. braziliensis* podem desenvolver lesões cutâneas ulceradas no local da inoculação (NOVAIS *et al.*, 2009), tornando-se, provavelmente os modelos mais úteis para entender a patogênese da doença, resistência à outras infecções e desenvolvimento de vacinas (DE MOURA *et al.*, 2005).

1.6 Tratamento das leishmanioses

Até o momento não há vacina eficaz contra as leishmanioses, e historicamente, a quimioterapia tem sido baseada no uso de metais pesados tóxicos, particularmente componentes de antimônio. Os antimoniais pentavalentes (Sb+5- Glucantime® - antimoniato de meglumina- e Pentostam® - estibogluconato de sódio) são os quimioterápicos com mais favorável índice terapêutico, considerados o tratamento de primeira linha para as leishmanioses (AREVALO *et al.*, 2007; LLANOS-CUENTAS *et al.*, 2008; SVS/MS, 2013). Possuem eficácia em torno de 85% (AREVALO *et al.*, 2007) e algumas vantagens, como a rápida eliminação renal e a limitada acumulação nos tecidos (BERMAN, 1997; BLUM *et al.*, 2004).

A administração é parenteral, por 20-30 dias, apresentando diferenças em taxas de cura, podendo essa variação estar associada a fatores relacionados ao hospedeiro e as características do parasito, influenciando na resposta ao tratamento. Poucos estudos têm sido realizados sobre a influência de fatores do hospedeiro, clínicos e a relação com a resposta imunológica sobre o resultado do tratamento (LLANOS-CUENTAS *et al.*, 2008).

Os antimoniais possuem ação leishmanicida por interferir na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania*, inibindo no parasito tanto a glicólise quanto a oxidação dos ácidos graxos, acompanhada da redução na produção de ATP e GTP (SOUZA *et al.*, 2010; SVS/MS, 2013).

Quando os antimoniais não são efetivos, outras medicações usadas incluem Pentamidina e Anfotericina B, mas são medicações que requerem administração injetável e supervisão clínica ou hospitalização durante o tratamento por causa dos possíveis efeitos secundários, além do alto custo (CHAN-BACAB; PEÑA-RODRIGUEZ, 2001).

Os antimoniais apresentam várias inconveniências que incluem dor no local da injeção, artralgias e mialgias, toxicidade cardíaca, e em alguns casos, insuficiência hepática e renal. Estas drogas também requerem tratamento prolongado e custo elevado (CHAN-BACAB; PEÑA-RODRIGUEZ, 2001). Verifica-se, com frequência, o abandono do tratamento, ou uso de subdosagem, o que tem acarretado resistência ao tratamento com antimoniais em alguns pacientes, o que é, de longe, o maior problema que delinea o tratamento com os antimoniais (BERMAN, 1988; BLUM *et al.*, 2004; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Os emergentes relatos da resistência ao antimônio em pacientes com leishmaniose em várias partes do mundo tem comprometido severamente a habilidade de controlar a doença (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Além disso, a resistência aos antimoniais pode significar uma situação alarmante frente ao aumento dos casos de co-infecção com HIV (OUELLETTE *et al.*, 2004). Um trabalho que avaliou as diferenças fenotípicas entre isolados de *L. braziliensis* de pacientes que não respondiam a terapia com antimônio mostrou que a resistência ao antimônio estava relacionada também à resistência a NO (GIUDICE *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2010). Portanto, novos tratamentos contra as leishmanioses ou estratégias para melhorar a segurança e eficácia das drogas correntes continuam extremamente necessárias.

1.7 Quimiocinas e seus receptores

As quimiocinas desempenham um papel importante no recrutamento de células inflamatórias e ativação de leucócitos, desempenhando atividade no desenvolvimento das respostas inatas e adaptativas (ROSSI; ZLOTNIK, 2000; ROT; VON ADRIAN, 2004; COLVIN *et al.*, 2004).

Já foram identificados mais de 44 diferentes tipos de quimiocinas e 21 tipos de receptores. A produção destas proteínas é estimulada por uma variedade de agentes: lipopolissacarídeos (LPS), vírus, bactérias, patógenos e citocinas, tais como IL-4, IL-13, IL-1 e IFN- γ . São secretadas por células epiteliais, endoteliais, leucócitos e outros tipos de células (ROT; VON ANDRIAN, 2004; MOSER *et al.*, 2004). As quimiocinas desempenham papéis importantes durante a resposta inflamatória por desencadearem a ativação de integrinas durante a adesão das células ao endotélio, induzir o recrutamento de linfócitos antígeno-específico para os tecidos periféricos em resposta a uma inflamação, e liberar enzimas de grânulos celulares (SPRINGER, 1994).

As quimiocinas são formadas por polipeptídeos (8-10 kDa) e classificadas em duas principais famílias de acordo o número e localização de resíduos de cisteínas N-terminais: CC com os dois primeiros resíduos de cisteína adjacentes uma a outra e próximas ao amino terminal, e família CXC, em que as duas primeiras cisteínas próximas ao domínio NH₂-terminal são separados por um aminoácido (ROLLINS, 1997; PEREIRA *et al.*, 2009).

As quimiocinas CC atraem principalmente monócitos e linfócitos T, apesar de que são também quimiotáticas para basófilos, eosinófilos e células NK (ROLLINS, 1997). As quimiocinas CXC são divididas em duas sub-famílias, aquelas que contêm a sequência ácido glutâmico-leucina-arginina, chamada de sequência ELR (ELR⁺), precedendo as duas primeiras cisteínas da molécula, e aquelas que não contêm essa sequência (ELR⁻). A presença dessa sequência está relacionada a um efeito predominante sobre a atração de neutrófilos e a ausência desta sequência está relacionada com a migração de linfócitos (BAGGIOLINI, 2001).

Em relação aos receptores de quimiocinas, já foram descritos 21 tipos. Estes são formados por cerca de 350 aminoácidos, compostos por um curto domínio NH₂-terminal, sete domínios transmembranares, ligados por três alças na porção intracelular e mais três na porção extracelular, mais um domínio carboxi (COOH) terminal intracelular. Os receptores das quimiocinas pertencem à superfamília dos receptores de sinalização intracelular acoplados

à proteínas G e exercem suas funções através da sua ligação a receptores encontrados na superfície das células (MURDOCH; FINN, 2000). A interação entre as quimiocinas e seus receptores é caracterizada por uma indistinção considerável: cada quimiocina se liga a vários receptores e cada receptor se liga a várias quimiocinas (TEIXEIRA *et al.*, 2006).

Os receptores são divididos em 4 famílias, CXCR, CCR, CX3CR e XCR. Os pertencentes à família CXCR estão envolvidos em várias funções diferentes na resposta inflamatória, como os receptores CXCR1 e CXCR2, expressos em células PMNs e que induzem a inflamação aguda. Proteínas induzidas por IFN- γ como CXCL10, conhecida anteriormente como IP-10, CXCL9 e CXCL11, ligam-se ao CXCR3, expresso em linfócitos T ativados, monócitos e células NK, induzindo tipicamente a inflamação crônica (THELEN, 2001).

1.8 Quimiocina CXCL10 na infecção por *Leishmania*

A infecção por *Leishmania* induz expressão de vários genes de quimiocinas no hospedeiro (RITTER; KORNER, 2002; ANTONIAZI *et al.*, 2004). Essas moléculas são críticas para a definição da composição do infiltrado celular inicial, e no eventual estabelecimento da doença, atuando como moléculas reguladoras e quimioatrativas (PIRMEZ *et al.*, 1990; TEIXEIRA *et al.*, 2006). Parasitos de *Leishmania* podem induzir monócitos e macrófagos a produzirem quimiocinas que agem de diferentes formas no recrutamento e indução dos componentes imunológicos (VARGAS-INCHAUSTEGUI *et al.*, 2009).

O gene CXCL10 em humanos foi isolado em 1985 por Luster, enquanto tratava um linfoma com IFN- γ . Através da ligação ao seu receptor CXCR3, esta quimiocina torna-se capaz de exercer funções como atividade quimiotática de células que expressem CXCR3+, indução de apoptose, regulação do crescimento celular e angiogênese em doenças infecciosas e inflamatórias (LIU *et al.*, 2011).

CXCL10 pertence a uma grande subpopulação de citocinas que são mediadores cruciais para a função de leucócitos, recrutamento de monócitos, macrófagos, polarização de células Th1, ativação e tráfico de células envolvidas nas respostas inflamatórias (DUFOR *et al.*, 2002; CHARO; RANSOHOFF, 2006). Também chamada de IP-10 (proteína induzível por IFN- γ), é uma pequena molécula (10 kDa) secretada principalmente por monócitos, neutrófilos, queratinócitos, células dendríticas, células mesenquimais, fibroblastos e células endoteliais em resposta a estímulos como uma infecção viral, LPS e IL-1 (DUFOR *et al.*,

2002; LEE; LEE; SONG, 2009). Liga-se com alta afinidade ao receptor CXCR3 (CHEN *et al.*, 2004), que é um receptor conhecido por estar expresso em vários tipos de células, tais como células T CD4+ e CD8+ ativadas e de memória, células NK, algumas populações de células dendríticas, células endoteliais, macrófagos e células B (VESTER *et al.*, 1999; RITTER; MOLL, 2000; COLVIN *et al.*, 2004; MOHAN *et al.*, 2005). Camundongos C57BL/6 infectados com *L. major*, na ausência de CXCR3, são capazes de montar uma resposta do tipo Th1 eficiente, porém falham em controlar a infecção, diminuindo a produção de IFN- γ (ROSAS *et al.*, 2005)

Além de CXCL-10, CXCL9 e CXCL11 são conhecidos por ativar CXCR3, sendo cada uma dessas interações induzidas por IFN- γ , produzido na resposta Th1, porém conduzem a distintos fenômenos biológicos *in vivo* (COLVIN *et al.*, 2004). CXCL10 quando induzida por IFN- γ , se liga com alta afinidade ao receptor CXCR3 (CHEN *et al.*, 2004).

O possível envolvimento das quimiocinas na LT humana foi investigado inicialmente em LCL e LCD causadas por *L. mexicana*. As lesões de indivíduos com LCL continham altos níveis de CCL2, CXCL9 e CXCL10; ao contrário, lesões de indivíduos com LCD expressavam predominantemente CCL3. Nesse estudo, os autores sugerem que, em LCL, a produção de CCL2 seria responsável pelo recrutamento de macrófagos mais maduros e/ou ativados, que por sua vez eliminariam os parasitos e controlariam a doença. Por outro lado, em LCD, CCL3 induziria a migração de células mais imaturas ou desativaria estas células, favorecendo a progressão da doença (RITTER *et al.*, 1996).

Injeção de CXCL10 em camundongos BALB/c infectados por *L. major* tem mostrado induzir um forte recrutamento e ativação de células NK (VESTER *et al.*, 1999; MULLER *et al.*, 2001). Trabalhos do nosso grupo com cepas de *L. braziliensis* de alta e baixa patogenicidade mostraram que camundongos BALB/c infectados na pata com cepa mais patogênica apresentam lesões que apesar de pequenas e não ulceradas demoram mais tempo para curar, sendo que a cura coincide com o aumento de células NK, da produção de IFN- γ e a expressão de CXCL10 nas lesões, sugerindo que o controle mais precoce da infecção possa ser dependente, em parte, dessas proteínas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2005).

Outros trabalhos demonstraram que o tratamento com CXCL10 em camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* pode diminuir o tamanho da lesão e a carga parasitária, acompanhado do aumento da produção de IFN- γ , IL-12 e NO por células do linfonodo, quando re-estimuladas com o antígeno *in vitro* (VASQUEZ; SOONG, 2006).

Trabalhos relatam ainda que, CXCL10 também atua na resposta protetora contra *L. donovani*, induzindo uma resposta celular tipo Th1, por meio da via de mediadores inflamatórios, como NO e citocinas pro-inflamatórias (GUPTA *et al.*, 2009).

O efeito biológico de CXCL10 também é regulado pela expressão de CXCR3 nas superfícies das células alvo (células T e monócitos). Camundongos CXCR3^{-/-} falham em controlar a infecção mesmo na presença da resposta imunológica Th1, demonstrando a necessidade de CXCR3 para a defesa do hospedeiro contra infecção por *L. major* (BARBI; BROMBACHER; SATOSKAR, 2008). Monócitos CD14⁺ são as células alvo para infecção por *Leishmania*, principais produtoras de CXCL10, e o principal tipo celular expressando CXCR3 em uma infecção *in vitro* (VARGAS-INCHAUSTEGUI *et al.*, 2010).

A infecção por *L. braziliensis* induz a produção de CXCL10 por células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e macrófagos, sendo encontrada uma maior expressão de CXCL10 e seu receptor CXCR3 em monócitos CD14⁺ e em pacientes infectados com LT, especialmente em pacientes com LCM que apresentam um aumento de CXCL-10, CD14⁺ e receptores para TNF (DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012). Em pacientes com LCL já foram detectados níveis elevados de CXCL10 e outros fatores pró-inflamatórios em lesões ativas, na pele e mucosa, sugerindo assim um possível envolvimento dessas moléculas na resolução da doença (MEDDEB-GARNAOUI; ZRELLI; DELLAGI, 2009; SERBINA *et al.* 2008; VARGAS-INCHAUSTEGUI; XIN; SOONG, 2009).

Considerando a função imunomoduladora *in vivo* do eixo CXCL10-CXCR3 nas leishmanioses e, em específico, na infecção por *L. braziliensis*, CXCL10 é considerado um potencial alvo farmacológico nesse tipo de doença, possivelmente sendo útil na implicação de novas estratégias terapêuticas.

2. JUSTIFICATIVA

No Brasil, a leishmaniose tegumentar (LT) representa um importante problema de saúde pública, apresentando elevados índices no país. No Estado do Ceará, a LT tem como agente etiológico a *Leishmania braziliensis* que pode causar lesões autolimitadas ou formas mais graves, como a mucocutânea, que apresenta comprometimento das mucosas da orofaringe, podendo levar à deformidades e/ou morte. As drogas disponíveis como tratamento de 1ª escolha para as leishmanioses são os antimoniais pentavalentes, que apesar de eficazes, apresentam várias inconveniências, uma delas é o surgimento de cepas resistentes.

Considerando que CXCL10 é uma citocina conhecida por favorecer o recrutamento e a ativação de células polarizadas para Th1, além de ativar células NK, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B, o tratamento com essa quimiocina poderá ser uma alternativa para a leishmaniose tegumentar humana, principalmente em pacientes refratários ao tratamento com os antimoniais. Dessa forma, este trabalho almeja contribuir para o desenvolvimento científico e estudos em uma área de grande importância para a saúde pública. Vale salientar que o controle e tratamento das leishmanioses é uma das prioridades da Organização Mundial da Saúde.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

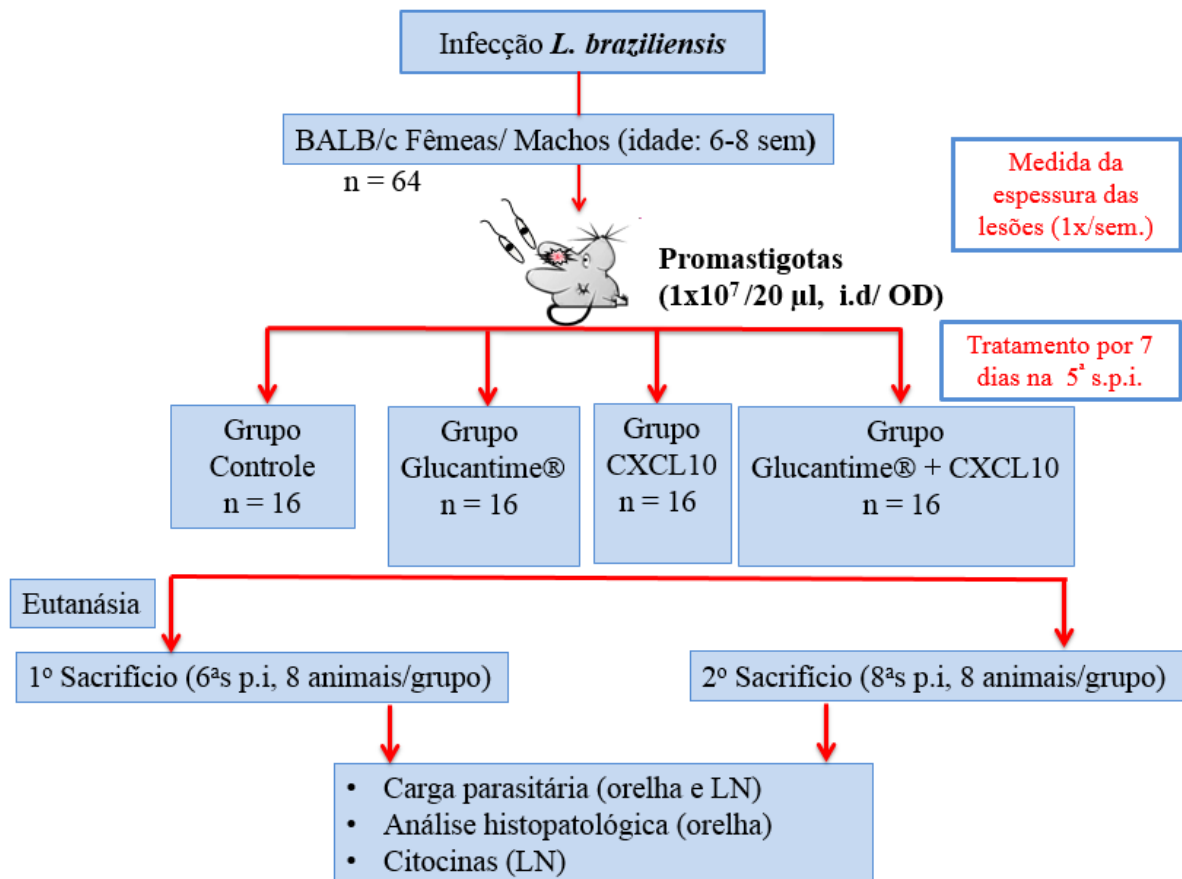
- Avaliar o efeito imunomodulador de CXCL10 em camundongos BALB/c infectados por cepa de *L. braziliensis* isolada de indivíduo refratário ao tratamento com antimônio.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a cinética das lesões causadas pela infecção por *L. braziliensis*;
- Quantificar a carga parasitária no sítio de inoculação do parasito (orelha) e linfonodo de drenagem da lesão;
- Determinar a concentração das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-14 e TGF- β em sobrenadantes de cultura de células do linfonodo de drenagem da lesão;
- Caracterizar os aspectos histopatológicos da lesão no sítio de inoculação do parasito (orelha).
- Avaliar o efeito imunomodulador da quimiocina CXCL10, e sua associação ao antimonial Glucantime em infecções causadas por *L. braziliensis*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho experimental



Fonte: elaborado pelos autores.

4.2 Reagentes e meios de cultura

- CXCL10 recombinante de camundongo (ThermoScientific, Waltham, MA, USA) foi reconstituído com água ultra pura (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) na concentração de 1 mg/mL. Alíquotas de 10 µg/mL foram conservadas a -20°C até o uso. A proteína foi diluída com salina, sendo administrada uma concentração final de 5 µg/kg em cada animal (10 µL).

Os meios de cultura utilizados neste trabalho foram:

- Meio Schneider (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)

O meio Schneider foi suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF – Gibco, Grand Island, NY), urina humana estéril a 2% e antibióticos (100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina). Será mencionado como ‘Schneider suplementado’ o meio contendo os componentes conforme descrito acima, e como Schneider aquele utilizado sem suplementos.

- Meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich)

Suplementado com 10% de SBF, 50 µM de 2-mercaptoetanol, 2 mM L-glutamina, e antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina). Será mencionado como ‘RPMI suplementado’ o meio contendo todos os componentes acima e como ‘RPMI’ aquele utilizado sem suplementos.

- Meio Neal, Novy & Nicolle (N.N.N).

Meio ágar sangue a 10%, foi suplementado com meio Schneider e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina).

4.3 Camundongos

Foram utilizados 64 camundongos BALB/c com 6-8 semanas de vida, machos (n=32) e fêmeas (n=32), provenientes do Biotério do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (DPML/FAMED/UFC). Os animais foram mantidos à temperatura ambiente, com ração comercial apropriada e água *ad libitum*, durante todo o período dos experimentos.

Para a manutenção da virulência da cepa de *L. braziliensis*, foram utilizados hamsters dourado, machos, com até 8 semanas de vida. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa em Animais (CEPA) da Universidade Federal do Ceará, registro no. 78/13 (anexo 1).

4.4 Parasitos

A cepa de *L. braziliensis* utilizada (LTCP-393) foi isolada de paciente com leishmaniose cutânea refratária ao tratamento com antimônio, cedida pelo Prof. Roque Pereira Almeida, do Departamento de Medicina e Patologia da Universidade Federal de Sergipe. A

virulência da cepa foi mantida através de passagem regular em hamster dourado. Após serem recuperados através de aspirado do linfonodo de drenagem da lesão, os parasitos foram cultivados a 25°C em meio N.N.N, contendo meio Schneider suplementado. Para garantir a virulência da cepa, só foram utilizados nos experimentos os parasitos até a 5ª passagem em cultura. Os parasitos foram submetidos a um ciclo de lavagem com salina estéril gelada, com centrifugação a 1.500 rpm, por 15 min a 4°C e ajustados com meio Schneider suplementado para as concentrações desejadas em cada experimento. A viabilidade dos parasitos foi analisada pela motilidade por meio da observação na câmara de Neubauer e microscópio óptico.

4.5 Infecção dos camundongos, tratamento e acompanhamento da espessura das lesões

Quatro grupos foram definidos no experimento: Grupo 1 - Animais infectados com *L. braziliensis* e não tratados (controle); Grupo 2- Animais infectados e tratados com Glucantime ; Grupo 3- Animais infectados e tratados com CXCL10 e Grupo 4- Animais infectados e tratados com Glucantime + CXCL10. Os camundongos (n=64) foram separados em grupos com 16 animais para a infecção. As formas promastigotas metacíclicas na fase estacionária foram inoculadas na derme da orelha direita na concentração de 10^7 em 20µL de salina estéril (DE MOURA et al., 2005), utilizando seringa para insulina de 0,3mL/cc e agulha 26G^{1/2}. O tamanho da lesão foi acompanhado a cada 7 dias, utilizando um paquímetro de escala circular (Mitutoyo, Japão) por um período de 56 dias, equivalente a 8 semanas de infecção. A espessura da lesão foi representada pela diferença entre a orelha direita infectada e a contralateral esquerda não infectada. Após 5 semanas de infecção, quando as lesões já eram aparentes (COSTA et al., 2011) os animais foram tratados. O tratamento com CXCL10 seguiu a metodologia previamente descrita por VASQUEZ et al. (2006) e consistiu de injeções, 5 µg/kg em cada animal (10 µL; I.M.), e no grupo tratado com o antimônio, injeções de Glucantime® (100 mg/kg, I.M.), utilizando-se seringa para insulina de 0,3mL/cc e agulha 26G^{1/2}. Os animais foram tratados por 7 dias seguidos, e então foram escolhidos aleatoriamente 8 de cada grupo e eutanasiados aos 45 dias (sexta semana de infecção e primeira semana pós tratamento- considerado o 1º tempo do sacrifício) e 60 dias após a infecção (oitava semana de infecção e terceira semana pós tratamento- considerado o 2º tempo do sacrifício), utilizando inalação por Halotano (Sigma-Aldrich), para a avaliação da carga

parasitária (linfonodo de drenagem e orelha), dosagem de citocinas (linfonodo de drenagem) (Figura 3) e análise histopatológica das lesões.

Figura 3 – Imagem macroscópica do linfonodo de drenagem da lesão em camundongos BALB/c infectados na derme da orelha direita com *Leishmania braziliensis* LTCP393 (resistente ao antimônio).



Fonte: elaborado pelos autores. Seta indicando o linfonodo de drenagem da lesão (retromaxilar).

4.6 Determinação da carga parasitária

O linfonodo de drenagem da lesão (retromaxilar), e porções da orelha (sítio de inoculação), foi retirado de maneira asséptica para a determinação da carga parasitária (Figura 3). A carga parasitária foi quantificada utilizando o Ensaio de Diluição Limitante (LDA) como descrito por Titus e colaboradores (1985). Brevemente, os linfonodos de drenagem da lesão (retromaxilar), e porções da orelha (sítio de inoculação) foram retirados assepticamente, macerados e homogeneizados em placa de Petri com 1 mL de meio Schneider (Sigma-Aldrich) e deixados em repouso por 5 min. Após a homogeneização, o material foi diluído para 8 concentrações diferentes (10 , 50 , 500 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7) em meio Schneider suplementado. Cem microlitros destas diluições foram distribuídos em placas de 96 poços, fundo chato, contendo meio ágar-sangue N.N.N., em sextuplicatas (6 poços/diluição). As placas foram seladas e incubadas a 25°C em B.O.D e observadas em microscópio invertido de

3 em 3 dias, até um máximo de 30 dias, para o registro das diluições que continham parasitos. O resultado da leitura das placas foi registrado no software ELIDA 12c para Windows (TASWELL, 1984) para o cálculo final do número de parasitos presentes nas amostras utilizadas.

4.7 Cultura de células do linfonodo de drenagem e dosagem de citocinas

Suspensão de um pool de células do linfonodo de drenagem da lesão (retromaxilar) de 4 animais de cada grupo (após o 42º e o 56º dia de infecção) foi centrifugada a 1.000 g por 15 minutos à 4°C. As células foram ajustadas para a concentração de 1×10^6 células/mL em RPMI suplementado (200 µL/poço), e cultivadas em placas de fundo chato, 96 poços. As células foram reestimuladas ou não com promastigotas de *L. braziliensis* (concentração de 1×10^7 células/mL). Após 72h de incubação em estufa a 37°C, 5% CO₂, os sobrenadantes das culturas foram coletados para a dosagem de citocinas.

4.8 Quantificação de citocinas através de ELISA

A técnica ELISA foi utilizada na determinação das citocinas IFN-γ e IL-4 (BD Biosciences, San Diego, CA), TNF-α (R&D Systems), IL-10 (BioLegend, San Diego, CA) e TGF-β (eBiosciences, San Diego, CA), utilizando os sobrenadantes das culturas de células do linfonodo de drenagem. Resumidamente, placas de 96 poços, fundo chato (TPP, Switzerland), foram sensibilizadas com anticorpo de captura anti-citocina purificado, na concentração determinada pelo fabricante, por 12 às 18h a 4°C. As placas foram lavadas utilizando a solução de lavagem recomendada (PBS com Tween 20 a 0,05%); foi realizado bloqueio com PBS e soro bovino fetal (SBF 10%) ou solução fornecida pelo fabricante, seguido de incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS + Tween 20, foram adicionados 50 µL das amostras e das diluições do padrão da citocina (para a elaboração de curva-padrão). As amostras para TGF-β foram ativadas conforme descrito pelo fabricante do kit. Todas as amostras e diluições foram avaliadas em duplicata. A placa foi incubada por mais 2 h à temperatura ambiente e em seguida lavada, e então as amostras foram incubadas por 1 hora também a temperatura ambiente com anticorpo de detecção ligado à enzima peroxidase. Após esse passo, a placa passou por nova lavagem e em seguida a solução substrato foi adicionada. Depois da incubação final, por 30 minutos à temperatura ambiente, a

reação foi parada com ácido fosfórico (1:20) e a densidade óptica foi avaliada no comprimento de onda de 450 nm, utilizando-se o software Softmax® Pro v.5 (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA).

4.9 Análise histopatológica das lesões

Para análise dos aspectos histopatológicos das orelhas dos animais infectados, tratados ou não, 4 animais de cada grupo foram eutanasiados nos dois tempos utilizados no experimento (sexta e oitava semana pós infecção). As orelhas foram retiradas e fixadas em formol tamponado a 10%, processadas e incluídas em parafina. O material foi cortado em secções de espessura de 5-6µm e corado pela hematoxilina-eosina. As alterações microscópicas foram observadas e analisadas em microscópio óptico levando em conta os seguintes parâmetros: exsudato celular, destruição tissular, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, plasmócitos, macrófagos, granulomas, edema, fibrose e parasitismo. Cada parâmetro foi avaliado segundo presença ou ausência do evento através de escores: 0 (ausência), 1 (presença de 1-25%), 2 (presença de 25-50%), 3 (>50%).

4.10 Análise estatística

Os dados obtidos são apresentados como média aritmética \pm erro padrão. O número de parasitos presentes nas lesões e linfonodos foram determinados utilizando o programa ELIDA (TASWELL, 1984). Para verificar a significância estatística entre os grupos, nos dados com distribuição normal onde foram comparados dois grupos independentes foi utilizado teste t-Student não-pareado. Para as comparações entre múltiplos grupos foi realizado o teste one-way ANOVA e se houve uma diferença significativa, os grupos foram comparados através do post teste Bonferroni. A análise dos parâmetros histopatológicos foi feita levando-se em conta os escores de cada animal. Todas as análises foram realizadas usando o software GraphPad Prism version 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e em todos os testes utilizados, a significância mínima foi aceita quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

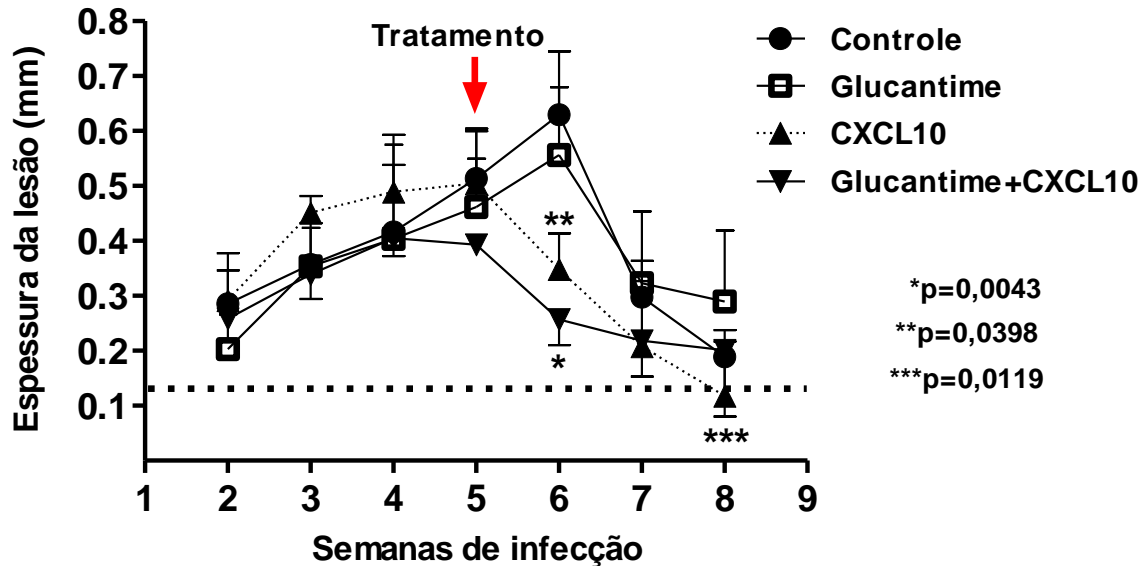
5.1 Avaliação da cinética das lesões

Para avaliar a cinética das lesões, foram realizadas medidas semanais das orelhas infectadas e não infectadas, sendo acompanhada até a oitava semana de infecção, período do segundo tempo de sacrifício dos animais. Nos quatro grupos avaliados, as lesões foram aumentando gradativamente e na quinta semana de infecção, quando a maioria das lesões já apresentavam ulcerações, foram iniciados os tratamentos, realizados por 7 dias seguidos (Gráfico 1, Figura 4).

Na primeira semana pós-tratamento (s.p.t), o que equivale à sexta semana de infecção, tanto no grupo tratado com CXCL10 ($0,035 \pm 0,065\text{mm}$) como no grupo que recebeu a associação CXCL10+Glucantime ($0,047 \pm 0,267\text{mm}$), a espessura das lesões apresentou regressão significativa ($p=0,0398$; $p=0,0043\text{mm}$, respectivamente) quando comparada ao grupo controle não tratado ($0,63 \pm 0,115 \text{ mm}$). O grupo tratado com Glucantime ($0,56 \pm 0,123 \text{ mm}$) apresentou o curso das lesões semelhante ao observado no controle (Gráfico 1). Neste período, primeira s.p.t, as lesões dos animais dos grupos Controle, Glucantime e CXCL10+Glucantime estavam ulceradas, fato não observado no grupo tratado com CXCL10 (Figura 4).

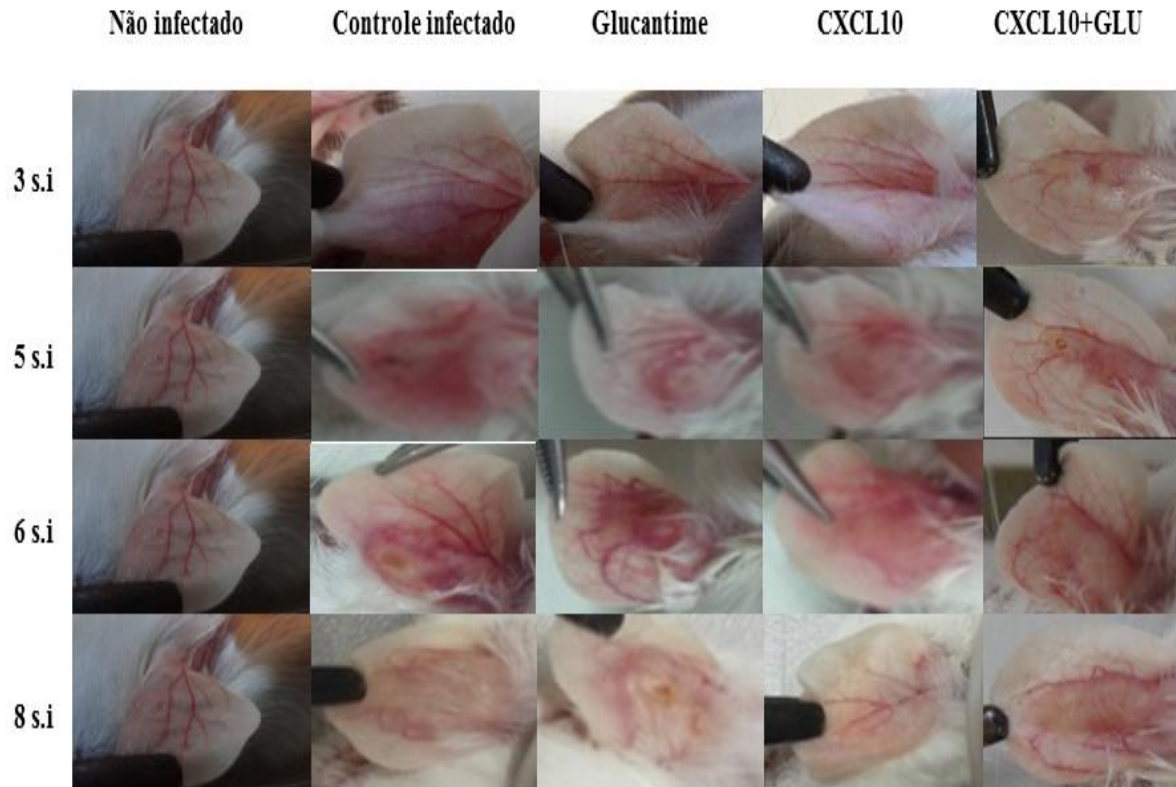
Na terceira semana pós-tratamento, que equivale à oitava semana pós-infecção, todos os grupos apresentaram diminuição na espessura das lesões. No entanto, vale salientar que somente nos animais tratados com CXCL10, as orelhas infectadas voltaram às suas espessuras normais ($0,12 \pm 0,099 \text{ mm}$; $p = 0,0119$), com regressão total das lesões (Gráfico 1; Figura 4).

Gráfico 1 – Efeito de CXCL10 no desenvolvimento das lesões em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* resistente ao antimônio.



Fonte: Elaborado pelo autor. Grupos de animais foram inoculados com 10^7 promastigotas de *L. braziliensis* por via intradérmica na orelha direita e o desenvolvimento da lesão foi monitorado durante 8 semanas de infecção nos quatro grupos (não tratado –Controle; tratado com Glucantime; tratado com CXCL10 e tratado com Glucantime+CXCL10). O tratamento foi realizado durante 7 dias a partir da quinta semana pós-infecção. A espessura das lesões foi determinada como a diferença entre a orelha direita infectada e a contralateral não infectada. Os resultados são expressos pela média aritmética \pm erro padrão. A linha tracejada significa medida normal de orelha de camundongo BALB/c. (*/**/****) Significância estatística quando $P < 0,05$ (em relação ao grupo Controle).

Figura 4 – Aspectos macroscópicos da orelha de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* refratária a antimônio e tratados com CXCL10.



Fonte: Elaborado pelo autor. As lesões foram monitoradas e fotografadas a cada 7 dias, da 3^a a 8^a semana de infecção. As setas indicam lesão.

5.2 Carga parasitária no sítio de inoculação do parasito (orelha) e linfonodo de drenagem da lesão

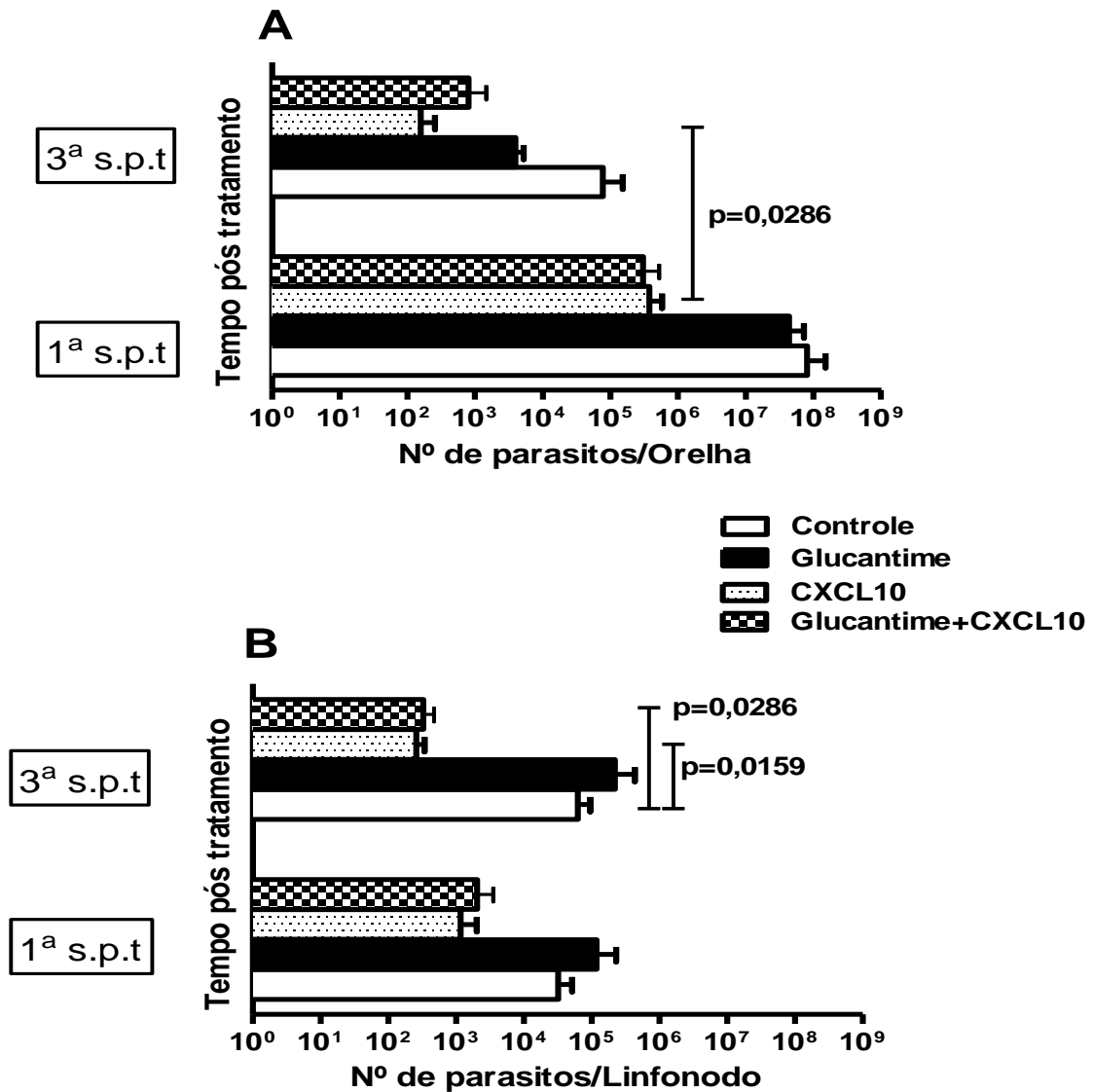
Avaliando a 1^a s.p.t foi possível observar um número menor de parasitos na orelha dos animais tratados com CXCL10 ($3,75 \times 10^5 \pm 2,09 \times 10^5$) e com a associação de CXCL10+Glucantime ($3,03 \times 10^5 \pm 2,23 \times 10^5$) em relação aos animais Controle ($8,06 \times 10^7 \pm 6,94 \times 10^7$) e aqueles tratados somente com Glucantime ($4,31 \times 10^7 \pm 2,94 \times 10^7$) (Gráfico 2A).

Na 3^a s.p.t, a carga parasitária na orelha dos animais de todos os grupos diminuiu, entretanto nos animais tratados com CXCL10 apresentou-se significativamente menor ($1,57 \times 10^2 \pm 0,98 \times 10^2$; $p = 0,0286$) do que aquela observada na 1^a s.p.t. ($3,75 \times 10^5 \pm 2,09 \times 10^5$) (Gráfico 2A). Ainda na 3^a s.p.t., a associação de CXCL10+Glucantime ($7,95 \times 10^2 \pm 6,64 \times$

10²) mostrou também uma diminuição no número de parasitos menor do que a observada no Controle e no grupo tratado com Glucantime (Gráfico 2A).

Quando avaliada a cinética da carga parasitária no linfonodo de drenagem da lesão, foi observado que o número de parasitos encontrados na 1^a s.p.t. foi menor do que na orelha, em todos os grupos (Gráfico 2B). Na 3^a s.p.t, o número de parasitos detectados no linfonodo dos grupos CXCL10 ($2,5810^2 \pm 0,84 \times 10^2$) e CXCL10+Glucantime ($3,30 \times 10^2 \pm 1,44 \times 10^2$) foi significativamente menor ($p=0,0159$; $p=0,0286$, respectivamente) quando comparado ao grupo Controle ($6,28 \times 10^4 \pm 3,17 \times 10^4$). Vale salientar que na 3^a s.p.t, no grupo Controle e no tratado com Glucantime não houve diminuição na carga parasitária (Gráfico 2B).

Gráfico 2 – Carga parasitária na lesão (A) e no linfonodo de drenagem da lesão (B) em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* resistente ao antimônio e tratados com CXCL10.



Fonte: Elaborado pelos autores. Número de parasitos nas orelhas (A) e linfonodos de drenagem (B) de camundongos BALB/c inoculados na derme da orelha direita com 10^7 promastigotas de *L. braziliensis* e divididos em quatro grupos (não tratado –Controle; tratado com Glucantime; tratado com CXCL10 e tratado com Glucantime+CXCL10). Grupos de animais ($n=8$ /grupo) foram eutanasiados na primeira e na terceira semana após tratamento (s.p.t). Os resultados são expressos pela média aritmética \pm erro padrão. Significância estatística quando $P < 0,05$.

5.3 Avaliação da reação inflamatória na lesão de orelha de camundongos BALB/c

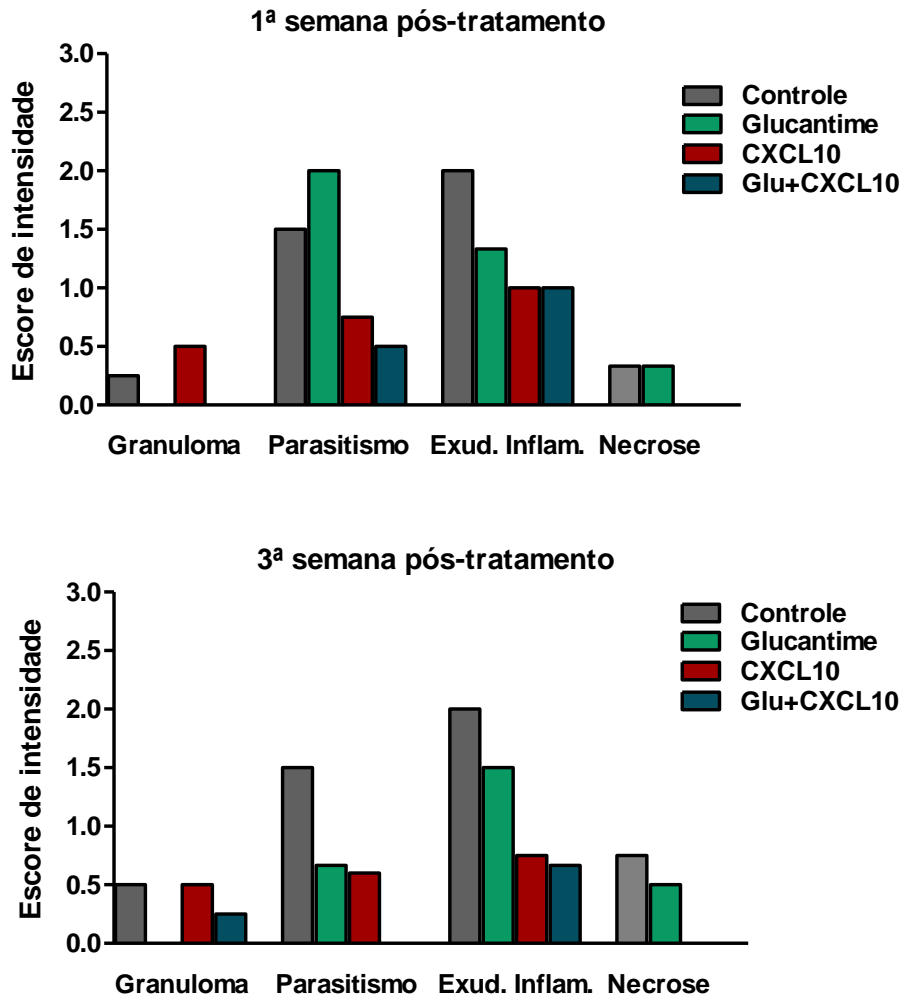
Para avaliar a resposta inflamatória induzida por CXCL10 e demais tratamentos nas orelhas infectadas, cortes histopatológicos das orelhas infectadas e de orelhas saudáveis (controle negativo) foram analisados.

Na análise histopatológica foi possível observar a presença de granulomas nos grupos Controle e tratados com CXCL10 nos dois períodos avaliados (1^a e 3^a s.p.t), e no grupo Glucantime+CXCL10 apenas na 3^a s.p.t (Gráfico 3, Apêndice I e II).

Parasitas foram encontrados em menor número nos grupos tratados com CXCL10 sozinho ou associados ao Glucantime, nos dois tempos avaliados. Em contrapartida, em relação ao Controle e Glucantime, ambos apresentaram escores maiores na 1^a s.p.t., e na 3^a s.p.t com diminuição do parasitismo apenas no grupo tratado com Glucantime (Gráfico 3, Apêndice I e II).

Em relação ao exsudato inflamatório, escores menores foram observados para os grupos CXCL10 sozinho e sua associação com Glucantime, tanto na 1^a quanto na 3^a s.p.t quando comparado ao Controle e Glucantime. Vale ressaltar ainda, que os únicos grupos que apresentaram necrose nos dois períodos avaliados foram Controle e Glucantime (Gráfico 3, Apêndice I e II).

Gráfico 3 – Parâmetros inflamatórios na lesão de orelha em camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* refratária ao antimônio e tratados com CXCL10.



Fonte: Elaborado pelos autores. Camundongos foram infectados e tratados como descrito no gráfico 1. Os animais foram eutanasiados com 1 e 3 semanas após tratamento, as amostras da orelha foram coletadas, processadas, incluídas em parafina e em seguida cortadas. As alterações histopatológicas foram observadas através de microscópio óptico (magnitude de 100x). Cada barra representa a média do somatório dos escores referentes aos parâmetros inflamatórios analisados: 0 (ausência), 1 (presença de 1-25%), 2 (presença de 25-50%) e 3 (>50%). Orelhas de animais sadios foram utilizadas como controle negativo. Glu = Glucantime. Exsu. Inflam. = exsudato inflamatório.

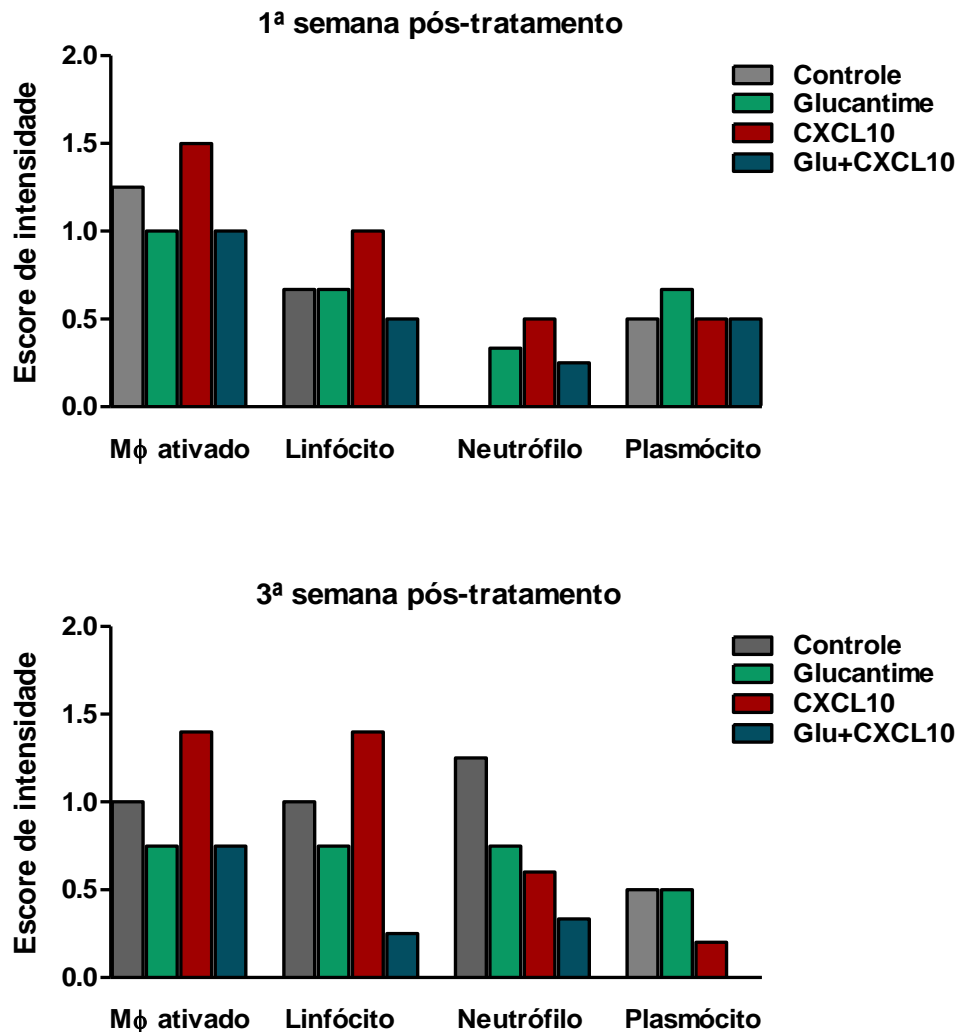
Quando avaliado a presença de macrófagos ativados, os animais do grupo tratado com CXCL10 foram os que apresentaram maiores escores na 1ª e 3ª s.p.t, seguido pelo grupo Controle. Observaram-se escores menores e semelhantes nos grupos Glucantime e Glucantime+CXCL10 (Gráfico 4, Apêndice I e II).

O tratamento com CXCL10 também obteve maior escore de linfócitos nos dois tempos avaliados, além disso, é interessante observar que o grupo Glucantime+CXCL10 foi o que obteve menor escore em relação a linfócitos, tanto na 1^a quanto na 3^a s.p.t. (Gráfico 4, Anexo 1 e 2).

A ocorrência de neutrófilos na lesão demonstrou ser um pouco mais acentuada no grupo CXCL10 na 1^a s.p.t. quando comparada aos grupos Glucantime e Glu+CXCL10. Porém, quando analisado a 3^a s.p.t os grupos Controle e Glucantime apresentam escores consideravelmente maiores, enquanto nos grupos CXCL10 e Glu+CXCL10 não houve mudança no perfil em relação a 1^a s.p.t (Gráfico 4, Apêndice I e II).

Em relação aos plasmócitos, no primeiro tempo avaliado 1^a s.p.t., os quatro grupos do estudo apresentaram escores aproximados, no entanto, no último período (3^a s.p.t.), apenas os grupos Controle e Glucantime continuaram a apresentar a presença dessas células em maior número, enquanto CXCL10 mostrou escores menores (Gráfico 4, Apêndice I e II).

Gráfico 4 – Exudato celular na lesão de orelha em camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* refratária ao antimônio e tratados com CXCL10



Fonte: Elaborado pelos autores. Camundongos foram infectados e tratados como descrito no gráfico 1. Os animais foram eutanasiados com 1 e 3 semanas após tratamento, as amostras da orelha foram coletadas, processadas, incluídas em parafina e em seguida cortadas. As alterações histopatológicas foram observadas através de microscópio óptico (magnitude de 100x). Cada barra representa a média do somatório dos escores referentes aos parâmetros inflamatórios analisados: 0 (ausência), 1 (presença de 1-25%), 2 (presença de 25-50%) e 3 (>50%). Orelhas de animais saudáveis foram utilizadas como controle negativo. Glu = Glucantime.

5.4 Dosagem de citocinas no linfonodo de drenagem da lesão

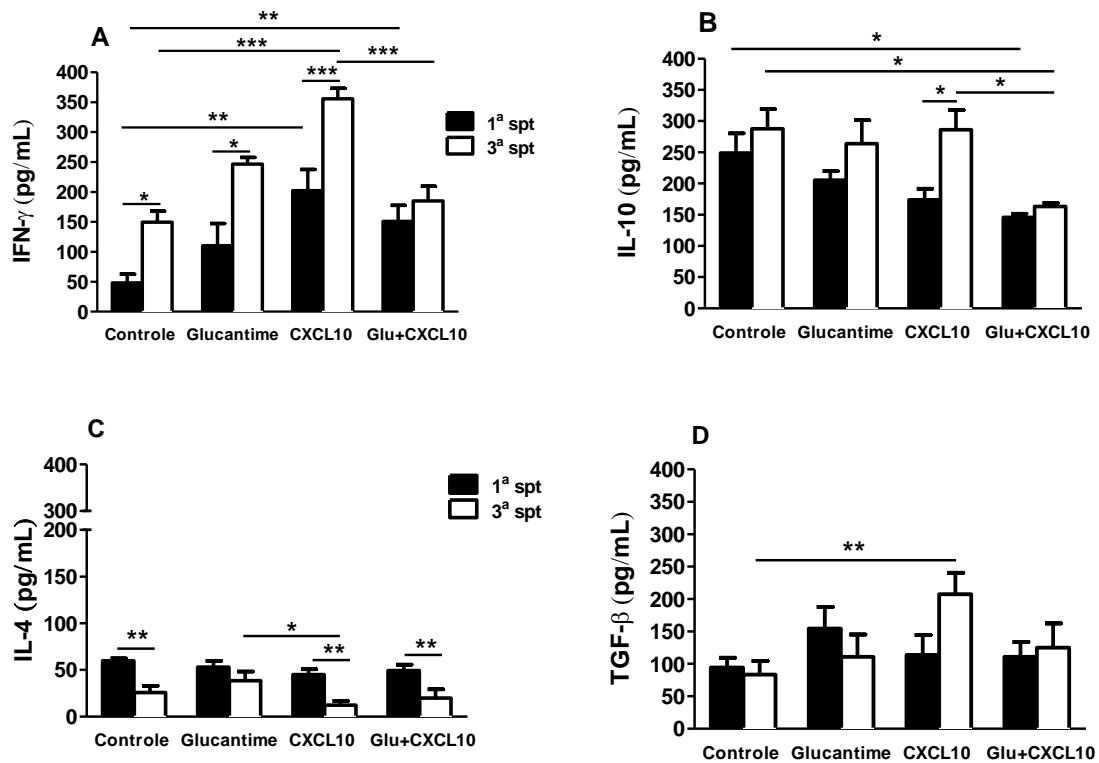
Os resultados mostraram que na 3ª s.p.t, o grupo que recebeu CXCL10 apresentou concentração de IFN- γ três vezes maior ($356,0 \pm 17,64$ pg/mL) do que a encontrada na 1ª s.p.t ($101,5 \pm 31,45$ pg/mL), e significativamente maior quando comparada ao grupo Controle

($149,0 \pm 18,88$ pg/mL), nos dois períodos avaliados. Foi observado ainda que, na 3^a s.p.t, a associação de CXCL10+Glucantime induziu 2 vezes menos IFN- γ ($135,0 \pm 12,36$ pg/mL) do que CXCL10 sozinho. Ainda em relação à 3^a s.p.t, apenas o grupo CXCL10+Glucantime não apresentou maior concentração de IFN- γ em relação a 1^a s.p.t. Este grupo também mostrou concentrações significativamente maiores ($202,2 \pm 35,64$ pg/mL) do que a do Controle na 1^a s.p.t. ($48,3 \pm 14,35$ pg/mL) (Gráfico 5A).

Em relação a IL- 4, houve produção significativamente maior durante a 1^a s.p.t, comparada à 3^a s.p.t nos grupos Controle, CXCL10 e CXCL10+Glucantime, exceto no Glucantime. Referente à 3^a s.p.t, CXCL10 induziu uma concentração duas vezes menor quando comparado ao Glucantime ($12,21 \pm 4,56$; $38,57 \pm 9,76$, respectivamente) resultados estes que foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$) (Gráfico 5C).

Quando analisadas as concentrações de IL-10, CXCL10 foi o único grupo que demonstrou uma produção significativamente maior na 3^a s.p.t em relação a 1^a s.p.t ($286,21 \pm 31,51$, $173,8 \pm 17,71$ pg/mL, respectivamente) (Gráfico 5B). Foi possível observar que, na 3^a s.p.t, a associação de CXCL10+Glucantime induziu menos IL-10 ($163,21 \pm 5,57$ pg/mL) do que CXCL10 sozinho ($286,21 \pm 31,51$ pg/mL), fato semelhante ao ocorrido com a produção de INF- γ para esse grupo (Gráfico 5A). Ainda em relação a IL-10, no grupo da associação de CXCL10+Glucantime, observou-se que a produção dessa citocina foi significativamente menor do que a do Controle, tanto na 1^a s.p.t ($145,7 \pm 5,95$, $249 \pm 31,49$; $p < 0,05$) quanto na 3^a s.p.t. ($163,21 \pm 5,57$, $288 \pm 31,15$; $p < 0,05$) (Gráfico 5B).

Gráfico 5 – Produção de citocinas IFN- γ (A), IL-10 (B), IL-4 (C) e TGF- β (D) no linfonodo de drenagem da lesão de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* refratária ao antimônio e tratados com CXCL10.



Fonte: Elaborado pelos autores. Camundongos BALB/c foram infectados como descrito no gráfico 1. Grupos de animais (n=8/grupo) foram eutanasiados na primeira e na terceira semana após tratamento (s.p.t), quando foram obtidos os linfonodos. Células do linfonodo de drenagem da lesão foram cultivadas e re-estimuladas in vitro com promastigotas vivas de *L. braziliensis* por até 72 h. Os sobrenadantes foram usados para a dosagem das citocinas. Os resultados são expressos pela média aritmética \pm erro padrão. (*/**/****) Significância estatística quando $P < 0,05$.

Quanto à citocina TGF- β , foi possível observar uma maior produção na 1ª s.p.t em relação à 3ª s.p.t apenas no grupo tratado com o antimônio; em contrapartida, nos grupos tratados com CXCL10 e com a associação CXCL10+Glucantime a maior produção ocorreu na 3ª s.p.t.. Este resultado foi significativo apenas no grupo tratado com CXCL10 ($207,5 \pm 32,95$; $p < 0,05$) em relação ao grupo Controle ($83,44 \pm 21,09$), na 3ª s.p.t (Gráfico 5D).

6 DISCUSSÃO

Um dos problemas do tratamento com os antimoniais pentavalentes nos últimos anos tem sido o aparecimento de cepas de *Leishmania* resistentes a essas drogas (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; SOUZA *et al.*, 2010). Foi observado que a resistência ao antimônio está também relacionada à resistência ao NO (GIUDICE *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2010). Adicionalmente, recentemente, as formas mais graves de leishmaniose cutâneas causadas por *L. braziliensis* têm sido relacionadas com a resposta imunológica associada ao aumento dos níveis de IL-4 e Arginase (COSTA *et al.*, 2011).

Apesar do perfil de resistência ao NO já ser descrito em infecções por *Leishmania*, pouco se sabe a respeito dos mecanismos que geram esse efeito. Estudos relatam que esse processo pode envolver principalmente a expressão da enzima iNOS, ou a atividade enzimática relacionada à moléculas do parasito (BALESTIERI *et al.*, 2002; HOLZMULLER *et al.*, 2005).

A ideia deste trabalho foi avaliar o efeito imunomodulador da quimiocina CXCL10 em camundongos BALB/c infectados com uma cepa de *L. braziliensis* resistente ao antimônio, utilizando um modelo experimental murino diferente do modelo tradicional de infecção na pata. Neste modelo, os parasitos são inoculados na derme da orelha, o que mimetiza melhor a infecção humana, por reproduzir de maneira mais evidente os aspectos da infecção natural tais como, a auto cura, a presença de lesão ulcerada, disseminação do parasito para os linfonodos e desenvolvimento de uma resposta imunológica mista Th1/Th2, caracterizada pela presença de células secretoras de IFN- γ , IL-4 e IL-10, confirmando a ausência de dominância de resposta Th2 observada em infecções por *L. major* em animais susceptíveis (DE MOURA *et al.*, 2005; VARGAS-INCHAUSTEGUI *et al.*, 2008).

Com relação à cinética das lesões na orelha foi observado que CXCL10 sozinho e a associação Glucantime+CXCL10 induziram lesões que não ulceraram e após o tratamento houve uma regressão significativa na espessura das mesmas, voltando mais rápido ao normal, quando comparadas as do grupo Controle e Glucantime. No grupo tratado apenas com Glucantime, as lesões continuaram a se desenvolver semelhante ao Controle, confirmando a resistência da cepa ao tratamento com o antimônio, como já descrito (COSTA *et al.*, 2011).

A produção de NO como fator determinante para a morte das formas amastigostas de *Leishmania* já é bem descrita, sendo confirmada em estudos experimentais onde o efeito

leishmanicida é bloqueado através de uma forma análoga a arginina, a L-N^G- Monometilarginina (L -NMMA), que bloqueia a síntese de NO, mantendo a parasitemia dos macrófagos (LIEW E COX, 1991; HOLZMULLER *et al.*, 2005). Neste trabalho, nos grupos Controle e tratado com Glucantime, os efeitos de persistência do parasito foram mais observados. Esse efeito de resistência possivelmente pode estar ocorrendo devido a não produção ou pouca produção de NO nesses grupos.

Alguns dos mecanismos que levam à resistência aos antimoniais, sejam em formas cutâneas ou viscerais, incluem a diminuição da concentração e absorção da droga dentro do parasito ou mesmo o aumento do efluxo das drogas utilizadas. Deve-se atentar ainda, que a não resposta pode ocorrer devido a incapacidade da redução do antimônio pentavalente Sb⁺⁵ para a forma trivalente Sb⁺³, uma vez que a atividade leishmanicida dos antimoniais é dependente da sua redução de Sb⁺⁵ para Sb⁺³ (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2011; MS/SVS, 2013).

Nos animais infectados com cepa resistente ao antimônio, CXCL10 e a associação com Glucantime foram capazes de induzir o controle da lesão mais precocemente. Estudos relatam que as quimiocinas produzidas no local da infecção são críticas para determinar a composição do infiltrado celular e que nas lesões de LCL os níveis elevados de CXCL10 são produzidos por células da epiderme e células estromais da derme, o que atrai células CXCR3+ e uma resposta do tipo Th1, sendo importante para a resolução de lesões cutâneas na leishmaniose (DÍAZ; ZERPA; TAPIA, 2013). Tem sido mostrado ainda que uma indução precoce e forte de CXCL10 acompanha a cura em camundongos infectados com *L. donovani*, enquanto o tratamento com CXCL10 exógeno protege contra a infecção, destacando sua relevância em abortar a patogênese da leishmaniose (MAJUMDER *et al.*, 2012). Em virtude do alto índice de falha terapêutica e desenvolvimento de espécies resistentes, opções terapêuticas com CXCL10 associadas ao tratamento padrão com antimônio poderiam gerar um melhor efeito na resolução da doença, uma vez que esta quimiocina é relacionada com atividade leishmanicida, essencial para geração de resposta protetora.

Os antimoniais pentavalentes são considerados de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses, porém, a ocorrência de pacientes refratários ao medicamento já foi constatada em estudo de casos com *L. braziliensis* (BÁFICA *et al.*, 2003). Neste trabalho de Báfica *et al.* (2003), para garantir que a cepa era de fato refratária ao tratamento com antimônio, o tratamento foi repetido por três ciclos como preconiza o Ministério da Saúde, mas as lesões continuaram aumentando. Glucantime foi então associado ao fármaco

Pentoxifilina, conduzindo a uma completa cicatrização. Foi mostrado que a cura das lesões com a associação dessas duas drogas ocorreu porque Pentoxifilina foi capaz de potencializar a expressão da enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS) que conduz a produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos, levando a morte do parasito (BÁFICA *et al.*, 2003).

Sabe-se que a quantidade de parasitos na lesão é fator determinante da severidade da doença. O menor número de parasitos nas lesões dos animais tratados com CXCL10 e com a associação Glucantime+CXCL10 na 3^a semana pós-tratamento sugere que essa quimiocina pode ser relevante para a diminuição da carga parasitária *in situ*. Esse fato foi confirmado na análise histológica das lesões dos animais desses grupos, em que foram encontrados parasitos em menor intensidade bem como ausência de necrose, sugerindo que ocorreu uma resposta mais eficiente, conduzindo mais rápido ao processo de cura. Trabalhos com BALB/c infectados por *L. amazonensis* demonstraram que o tratamento com CXCL10 reduziu a carga parasitária nesses animais (VASQUEZ; SOONG, 2006). CXCL10 poder induzir a produção de IL-12 por CD4⁺ e conseqüentemente o aumento desta citocina regula positivamente a resposta de células TCD4⁺ e da produção de IFN- γ , conduzindo ao controle do patógeno (OGHUMU *et al.*, 2010). O controle no número de parasitos, quando os animais foram tratados com CXCL10 e com Glucantime+CXCL10, pode ser a resposta para a ocorrência das lesões menores e não ulceradas observadas nesses grupos, sugerindo que CXCL10 pode controlar a infecção causada por cepas de *L. braziliensis* que não respondem bem ao tratamento por antimônio.

A menor carga parasitária nesses grupos corrobora ainda com os resultados encontrados no histopatológico, com presença de granulomas no grupo CXCL10 nos dois períodos avaliados, e no grupo Glucantime+CXCL10 na 3^a s.pt., refletindo que pode estar ocorrendo uma resposta de defesa ao parasito, fato que coincide com as menores lesões apresentadas por esses grupos. Embora o grupo Controle também tenha apresentado granulomas nos dois tempos avaliados, vale salientar que a formação de um granuloma nem sempre está associada com o controle do parasito, e a efetividade dos granulomas para matar os parasitos depende do grau de maturação do granuloma (MURRAY, 2001). Apenas os granulomas maduros desenvolvem mecanismos leishmanicidas eficientes para matar os parasitos (NIETO *et al.*, 2011).

Os mecanismos imunológicos que conduzem a cura das infecções por *L. braziliensis* são dependentes da produção de diferentes subpopulações de linfócitos TCD4⁺, com ênfase nas células de perfil Th1. Nesse contexto, o infiltrado celular na lesão é primordial

para definir o curso da doença. Vale salientar a maior presença de macrófagos ativados e linfócitos no grupo CXCL10 observados nas lesões, o que reflete o efeito quimiotático e ativador dessa quimiocina (DUFOUR *et al.*, 2002; CHARO; RANSOHOFF, 2006). Acredita-se que na presença de CXCL10 os linfócitos Th1 são estimulados a produzirem IFN- γ que, por sua vez, ativa macrófagos infectados e estimula a ação leishmanicida dessas células via NO (GUPTA *et al.*, 2009). Sugere-se, no presente trabalho, a participação dos macrófagos ativados no combate à infecção, contribuindo para as menores lesões e as baixas cargas parasitárias observadas nos animais tratados com CXCL10.

Nos grupos Controle e Glucantime (que se comporta como no Controle, devido ao perfil de resistência) foram encontradas as maiores lesões, corroborando com a maior quantidade de parasitos encontrados, tanto na lesão da orelha como no linfonodo de drenagem. Estudos com o mesmo modelo de infecção e a mesma cepa resistente (LTCP393) utilizada no presente trabalho, corroboram com os dados apresentados, onde os parasitos resistentes ao NO, foram também encontrados em maior número nas lesões dos animais infectados com a cepa resistente, além de induzir um infiltrado inflamatório mais intenso (COSTA *et al.*, 2011). Os achados histopatológicos do presente trabalho também mostraram que os animais dos grupos Controle e Glucantime apresentaram uma inflamação mais intensa, com mais edema, ulceração das lesões, presença de necrose e maior infiltrado celular, principalmente com mais polimorfonucleados (Apêndices I e II). Infecção de *L. major* em animais C57BL/6, que se sabe são naturalmente resistentes nesse modelo de infecção por *Leishmania*, demonstram que quando infectados com um isolado resistente ao tratamento com antimônio, desenvolvem lesões muito maiores, associadas a um elevado número de parasitos, não levando à cura (ANDERSON; MENDEZ; SACKS, 2005).

A manifestação de lesões mais proeminentes e ulceradas nos grupos Controle e Glucantime podem estar associadas a menor ativação de macrófagos e possivelmente menos NO, presença de menos linfócitos e consequente aumento de plasmócitos. Estas, são células responsáveis pela produção de imunoglobulinas do tipo IgG contra o parasito, que desempenham o papel de opsonização das formas de *Leishmania*, permitindo assim a ligação do patógeno aos receptores Fc γ R presentes nos macrófagos, que por sua vez estimulam a produção de IL-10 por esses macrófagos, promovendo a progressão da doença (ALEXANDE; BROMBACHER, 2012).

Outras células que podem estar relacionadas à patologia da doença e estavam presentes nos grupos Controle e Glucantime em maior quantidade na 3^a s.p.t. são os

neutrófilos. Sabe-se que estas células são importantes para a resposta imunológica e estão entre as primeiras células que chegam ao sítio de inoculação do parasito e as principais células que constituem o exsudato celular nos processos inflamatório (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004). Trabalhos relatam que *Leishmania* fagocitadas por neutrófilos são capazes de retardar a apoptose dos mesmos, mas não evitam o processo, e os corpos apoptóticos desses neutrófilos, expressando fosfatidilserina são reconhecidos e fagocitados pelos macrófagos que chegam ao local depois, promovendo, desta forma, a entrada silenciosa dos parasitos, estimulando negativamente a produção de IL-12 pelas CDs, e conduzindo à uma resposta não protetora (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004; CECÍLIO *et al.*, 2014).

Macrófagos ativados também foram observados nos grupos do Controle e Glucantime, embora estivessem em menor quantidade do que aqueles encontrados nos animais tratados com CXCL10. E por que esses macrófagos ativados não foram suficientes para controlar a doença mais cedo nesses grupos? Vale lembrar que a cepa de *Leishmania* utilizada nesse experimento é resistente ao Glucantime e a NO também. Na literatura, há relatos de outros produtos do metabolismo do oxigênio envolvidos na explosão respiratória em macrófagos murinos ativados, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion superóxido (O_2^-) que também estariam implicados na eliminação de *Leishmania* (VAN ASSCHE *et al.*, 2011). Outro estudo demonstrou que, em macrófagos infectados por *L. braziliensis* in vitro, a eliminação dos parasitos foi associada à produção de TNF- α e superóxidos (NOVAIS *et al.*, 2009). A produção de NO também pode ser influenciada pela presença da citocina IL-10. Foi visto que IL-10 induz uma ausência de resposta dos macrófagos a sinais de ativação e impede a morte de amastigotas por inibir a produção de TNF- α e NO (GHALIB *et al.*, 1995; NYLEN *et al.*, 2007). É importante ressaltar também que a persistência do parasito, causada em parte pelos seus mecanismos de evasão, é um fator que pode determinar a duração da doença e a evolução clínica para as formas mais graves, e um desses mecanismos é o metabolismo da arginina. Iniesta *et al.* (2001) mostraram que dependendo do tipo de arginase que a célula hospedeira expressa, o metabolismo da arginina pode resultar na produção de NO, ou em L-ornitina, sendo que NO é tóxico para o parasito, enquanto L-ornitina é essencial para o seu crescimento.

Nos linfonodos, onde realmente é montada a resposta imune específica aos parasitos, observou-se que tanto no grupo CXCL10 quanto no grupo da associação de CXCL10+Glucantime ocorreu uma diminuição significativa na carga parasitária na 3^a semana

pós-tratamento em relação ao Controle, que por sua vez, não demonstrou queda no número de parasitos nos dois tempos avaliados.

Já se sabe que em animais infectados por *L. braziliensis*, mesmo após a cura clínica, ocorre a persistência de parasitos em seus linfonodos (DE MOURA *et al.*, 2005; ROCHA *et al.*, 2007). O linfonodo é conhecido como um importante sítio de proliferação do parasito durante a infecção por *Leishmania*, e um dos primeiros órgãos a ser afetado durante a disseminação sistêmica do parasito, podendo esses persistirem indefinidamente dentro de macrófagos e/ou células dendríticas nos linfonodos de drenagem do sítio de inoculação, facilitando a modulação e manutenção da memória imunológica (MOLL; FLOHE; BLANK, 1995). Além disso, estudos relatam que *Leishmania* também é capaz de persistir dentro de fibroblastos nos linfonodos, devido essas células apresentarem baixa capacidade de produzir NO, e desta forma não controlando o crescimento do parasito, mesmo na presença de IFN- γ (BOGDAN *et al.*, 2007).

A maior diminuição dos parasitos no linfonodo quando tratado com CXCL10 pode estar relacionada a uma maior produção de IFN- γ , citocina fundamental para a eliminação do parasito. Acredita-se que as citocinas estão diretamente envolvidas com a produção de quimiocinas e podem preceder a expressão de algumas quimiocinas, que, por sua vez, induzem a produção de mediadores inflamatórios adicionais (TEIXEIRA *et al.*, 2006). Neste trabalho, os resultados demonstraram que na 3^a s.p.t, o grupo CXCL10 apresentou a maior produção de IFN- γ e no mesmo período (3^a s.p.t) foi observado baixa produção de IL-4.

CXCL10 parece contribuir para uma resposta Th1, essencial para eliminação dos protozoários causadores da leishmaniose cutânea. A baixa concentração de IL-4 e a maior concentração de IFN- γ nos animais tratados com CXCL10, possivelmente permitiu uma resolução precoce da lesão. Recentemente foi mostrado que camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* e tratados com CXCL10 antes das lesões aparecem apresentaram concentrações mais elevadas de IFN- γ e IL-12 no início da infecção e concentrações reduzidas de IL-4 e IL-10, quando comparados com os animais Controle, coincidindo com a resolução da lesão (GUERRA; TEIXEIRA, 2013). Estes dados estão de acordo com os achados da literatura de que a baixa infectividade de *L. braziliensis* em camundongos BALB/c está relacionada com a capacidade destes animais desenvolverem uma forte resposta Th1, e a cura é acompanhada por um aumento de IFN- γ e dependente desta citocina, pois camundongos quando tratados com anti-IFN- γ , apresentaram aumento significativo na espessura das lesões e a infecção não se resolvia (DEKREY; LIMA; TITUS, 1998).

CXCL10 é induzida por IFN- γ e exerce quimiotaxia sobre células T CD4⁺ ativadas e de memória, células CD8⁺, células NK, macrófagos e alguns subtipos de células dendríticas (CHEN *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2005) desempenhando um papel decisivo para o controle do parasito. O papel crítico das quimiocinas é evidenciado em casos de LCL versus a forma difusa causada por *L. mexicana*. Na forma LCL um perfil Th1 é observada nas lesões constituídas por CCL2, CXCL10 e CXCL9 e está associada com um infiltrado dérmico de macrófagos e um grande número de células CD4⁺. Em contrapartida, em LCD há predomínio de uma resposta Th2 associada à expressão de CCL3, e o infiltrado dérmico é mais difuso, com menor número de células CD4⁺, demonstrando o potencial de quimiocinas para estratégias imuno-terapêuticas (OGHUMU *et al.*, 2010). Além disso, alguns trabalhos têm mostrado o potencial terapêutico de CXCL10 na infecção por outras espécies de *Leishmania*, onde o tratamento com CXCL10 em camundongos BALB/c susceptíveis à infecção por *L. major* resulta no aumento da atividade citotóxica de células NK, contribuindo para a eliminação do parasito (MULLER *et al.*, 2001).

A maior produção de IL-4 na 1^a s.p.t no grupo Glucantime pode refletir a maior exacerbação da doença e o perfil de resistência. Esses dados já eram esperados, uma vez que a resistência encontrada na cepa de *Leishmania* utilizada neste trabalho é relatada com altos níveis de IL-4 e produção de arginase (COSTA *et al.*, 2011). Os dados estão de acordo com um trabalho em que foram utilizados camundongos BALB/c infectados com a mesma cepa resistente (LTCP393) e uma susceptível (LTCP15171), e as maiores lesões, carga parasitária, replicação e persistência dos parasitos foram observadas nos animais infectados com a cepa resistente, correlacionando-se com uma resposta Th2 e principalmente associada à elevados níveis de IL-4 (COSTA *et al.*, 2011).

A susceptibilidade da infecção por *L. major* em camundongos BALB/c é bem estabelecida, e apresenta predominância de células Th polarizadas para uma resposta do tipo Th2, levando a produção de citocinas anti-inflamatórias tais como IL-4, IL-5 e IL-13 conduzindo a progressão da lesão (DA SILVA SANTOS; BRODSKYN, 2014). Essas citocinas são caracterizadas por favorecer a multiplicação do parasita, inibindo a produção de NO por macrófagos ativados por IFN- γ (BRELAZ-DE-CASTRO *et al.*; 2012).

Outras citocinas como IL-10 e TGF- β são responsáveis pelo controle das respostas imunológicas em LC, porém também atuam na patologia da doença, desativando os mecanismos de combate por parte dos macrófagos e levando à persistência do parasito (DA SILVA; BRODSKYN, 2014). Dentre as funções imunossupressoras de IL-10 incluem,

diminuição da apresentação de antígenos aos receptores de células T, diminuição da produção de IL-12 e inibição de iNOS (BUXBAUM, 2013).

No presente trabalho, foram encontrados níveis altos de IL-10 na 3^a s.p.t, no grupo CXCL10. Isso sugere que esta citocina pode estar agindo com função de imunomodulação, não permitindo uma inflamação exacerbada, uma vez que o maior pico na produção de IFN- γ foi observado no grupo CXCL10 neste mesmo tempo, mas as lesões estavam menores e não ulceradas quando comparadas aquelas dos grupos Controle e Glucantime. Interessante que quando CXCL10 foi associado ao Glucantime, não foi observada diferença nos dois tempos avaliados, o mesmo ocorrendo para TGF- β . Esse fato pode estar relacionado com a menor produção de IFN- γ nesse grupo e, portanto, uma menor modulação por IL-10.

Estudos anteriores relataram que TGF- β possui capacidade de inativar macrófagos, consequentemente inibindo a produção de NO por parte dessas células e que essa citocina pode bloquear o efeito de IFN- γ , que se sabe ser importante mediador na destruição de *Leishmania* (BARRAL, *et al.*, 1993).

Em resumo, os principais achados deste trabalho sugerem que a quimiocina CXCL10 surge como um potencial alvo para auxiliar na terapia de pacientes infectados com cepas de *Leishmania* que não respondem ao tratamento convencional, por serem resistentes ao antimônio e ao NO. Não se pode esquecer que, CXCL10 como toda citocina está envolvida em diferentes funções e fenômenos durante uma resposta inflamatória e na homeostasia, portanto, sua administração pode apresentar alguns efeitos adversos. Quanto a isso, é importante salientar que neste trabalho o efeito benéfico de CXCL10 na infecção por *L. braziliensis* resistente a antimônio foi observada com apenas 7 aplicações da proteína, um tempo curto, e o mesmo ocorreu quando CXCL10 foi associada ao antimônio. Não avaliamos aqui uma menor concentração de Glucantime na associação com CXCL10, mas provavelmente isso poderia ser uma opção, o que poderia minimizar a toxicidade do antimônio, beneficiando o doente.

7 CONCLUSÃO

Em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania braziliensis* refratária ao tratamento com antimônio, CXCL10 sozinho ou associado com Glucantime foi capaz de controlar mais cedo a progressão da doença, induzindo lesões menos proeminentes, não ulcerada, diminuição da carga parasitária tanto no sítio de inoculação como no linfonodo de drenagem da lesão, orquestrada por uma resposta imunológica com aumento de IFN- γ e baixa produção de IL-4, e o controle da inflamação provavelmente sendo modulado por IL-10 e TGF- β .

Sugere-se que CXCL10 sozinho ou associado ao antimônio é um potencial alvo para auxiliar na terapia das leishmanioses.

REFERÊNCIAS

- ABDELLATIF, M. Z. M. ; EL-MABROUK, K.; EWIS, A. A. An Epidemiological Study of Cutaneous Leishmaniasis in Al-Jabal Al-Gharbi, Libya. **Kore. Soci. for Parasit. and Trop. Med.**, v. 51, n. 1, p. 75-84, 2013.
- AFONSO, L. C. C.; SCOTT, P. Immune Responses Associated with Susceptibility of C57BL/10 Mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect. and Immun.**, v. 61, n. 7, p. 2952-2959, 1993.
- AGUILAR-TORRENTERA, F.; CARLIER, Y. Immunological factors governing resistance and susceptibility of mice to *Leishmania major* infection. **Revista Latino. Am. de Microbi.**, v. 43, n. 3, p. 135-142, 2001.
- ALEXANDER, J.; BROMBACHER, F. T helper1/t helper2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: is this paradigm still relevant? **Front. in Immun.**, v. 3, 3:80. doi: 10.3389, 2012.
- ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immun. Lett.**, v. 99, p. 17-23, 2005.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Jour. of Cell Scie.**, v. 112, p. 2993-3002, 1999.
- ALMEIDA, M. C.; BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. **Memó. do Instit. Oswa. Cruz**, v. 8, n. 7, p. 861-870, 2003.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ANDERSON, C. F.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. J.; SACKS, D. CD4+ CD25–Foxp3– Th1 cells are the source of IL-10–mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. **The Jour. of Experim. Med.**, v. 204, n. 2, p. 285-297, 2007.
- ANDERSON, C. F.; MENDEZ, S.; SACKS, D. L. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. **The Jour. of Immun.**, v. 174, p. 2934-2941, 2005.
- ANTONELLI, L. R. V.; DUTRA, W. O.; ALMEIDA, R. P.; BACELLAR, O.; GOLLOB, K. J. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. **Clin Exp Immunol**, v. 136, p. 341-348, 2004.
- ANTONIAZI, S.; PRICE, H. P.; KROPF, P.; FREUDENBERG, M. A.; GALANOS, C.; SMITH, D. F.; MULLER, I. Chemokine gene expression in toll-like receptor-competent and -deficient mice infected with *Leishmania major*. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 5168-5174, 2004.
- AREVALO, J.; RAMIREZ, L.; ADAUI, V.; ZIMIC, M.; TULLIANO, G.; MIRANDA-VERASTEGUI, C.; LAZO, M.; LOAYZA-MURO, R.; DE DONCKER, S.; MAURER, A.; CHAPPUIS, F.; DUJARDIN, JC.; LLANOS-CUENTAS, A. Influence of *Leishmania*

(*Viannia*) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. **The Jour. of Infect. Disea.**, v. 195, p. 1846-1851, 2007.

AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian J Med Res**, v. 119, n. 6, p. 238-258, 2004.

BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.; RIBEIRO DE JESUS, A.; DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J.; CARVALHO, E. M. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infect. and Immun.**, v. 70, n. 12, p. 6734-6740, 2002.

BÁFICA, A.; OLIVEIRA, F.; FREITAS, L. A. R.; NASCIMENTO, E. G. BARRAL, A. American Cutaneous Leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs: successful treatment using combination of N-Methylglucamine Antimoniate plus Pentoxifylline. **Interna. Jour. of Dermat.**, v. 42, p. 203-207, 2003.

BAGGIOLINI, M. Chemokines in pathology and medicine. **J. Intern. Med.** v. 250, p. 91-104, 2001.

BALESTIERI, F. M., QUEIROZ, A. R., SCAVONE, C., COSTA, V. M., BARRAL-NETTO, M., ABRAHAMSOHN IDE, A. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Micro. Infect.**, v. 4, p. 23-29, 2002.

BALDWIN, T. M.; ELSO, C.; CURTIS, J.; BUCKINGHAM, L.; HANDMAN, E. The Site of *Leishmania major* Infection Determines Disease Severity and Immune Responses. **Infect. and Immun.**, v. 71, n. 12, p. 6830-6834, 2003.

BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; YONG, E. C.; BROWNELL, C. E.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Transforming growth factor β as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proce. of the Nati. Acad. of Scie.**, v. 90, p. 3442-6, 1993.

BARRAL, A.; GUERREIRO, J.; BOMFIM, G.; CORREIA, D.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, p. 256-259, 1995.

BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BROWNELL, C. E.; SKEIKY, Y. A.; ELLINGSWORTH, L. R.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Scien.**, v. 257, p. 545-548, 1992.

BARBI, J.; BROMBACHER, F.; SATOSKAR, A. R. T cells from *Leishmania major*-susceptible BALB/c mice have a defect in efficiently up-regulating CXCR3 upon activation. **The Jour. of Immun.**, v. 181, p. 4613-4620, 2008.

BELKAID, Y.; BLANK, R. B.; SUFFIA, I. Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. **Immun. Reviews**, v. 212, p. 287-300, 2006.

BELKAID, Y.; PICCIRILLO, C. A.; MENDEZ, S.; SHEVACH, E. M.; SACKS, D. L. CD4+ CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v. 420, p. 502-507, 2002.

BELKAID, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. **Nature Immunol.**, v. 7, p. 875-888, 2007.

BELKAID, Y.; VON STEBUT, E.; MENDEZ, S.; LIRA, R.; CALER, E.; BERTHOLET, S.; UDEY, M. C.; SACKS, D. CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. **J. Immunol.**, v. 168, p. 3992-4000, 2002.

BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: Biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. **Infect. Dis.**, v. 10, n. 3, p. 560-586, 1988.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: Clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinic. Infect. Dis.**, v. 24, p. 684-703, 1997.

BEZERRA, H. S. S.; VIANA, J. R.; TEIXEIRA, M. J.; CHAVES, C. R.; ARAUJO, D. B.; FILHO, J. H. C. L. Avaliação do teste de aglutinação direta na detecção da infecção por *Leishmania (viannia) braziliensis* em possíveis reservatórios de leishmaniose tegumentar americana no estado do Ceará. **Revista da Societ. Bras. de Med. Trop.**, v. 29, n. 2, p. 181-184, 1996.

BEZERRA, H. S.; TEIXEIRA, M. J. Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates on *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in BALB/c mice. **Mem. do Instit. Oswa. Cruz**, v. 96, n. 3, p. 349-351, 2001.

BLUM, J.; DESJEUX, P.; SCHWARTZ, E.; BECK, B.; BECK, B.; HATZ, C. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. **Jour. of Antimicrob. Chemother.**, v. 53, n. 2, p. 158-166, 2004.

BOGDAN, C.; DENKERS, E. Y.; GAZINELLI, R. T. Phagocyte effector functions against *Leishmania* parasites. In: Protozoans in macrophages. **Landes Bioscie.**, p. 193-206, 2007.

BORGES, M. M. A.; CAMPOS-NETO, P.; SLEATH, K. H.; GRABSTEIN, P. J.; MORRISSEY, P. J.; SKEIKY, Y. A. W.; REED, S. G. Potent stimulation of the innate immune system by a *Leishmania brasiliensis* recombinant protein. **Infect. and Immune.**, v. 69, n. 9, p. 5270-5277, 2001.

BOZZA, M.; SOARES, M. B. P.; BOZZA, P. T.; SATOSKAR, A. R.; DIACOVO, T. G.; BROMBACHER, F.; TITUS, R. G.; SHOEMAKER, C. B.; DAVID, J. R. The PACAP-type I receptor agonist maxadilan from sand fly saliva protects mice against lethal endotoxemia by a mechanism partially dependent on IL-10. **European Journ. Immun.**, v. 28, p. 3120-3127, 1998.

BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. A.; DE ALMEIDA, A. F.; DE OLIVEIRA, A. P.; DE ASSIS-SOUZA, M.; DA ROCHA, L. F.; PEREIRA, V. R. A. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. **Elsevier**, n. 279, p. 180-186, 2012.

BUXBAUM, L. U. *Leishmania mexicana* Infection Induces IgG to Parasite Surface Glycoinositol Phospholipids that Can Induce IL-10 in Mice and Humans. **PLoS Neglect. Trop. Diseases**, v. 7, n. 5, p. e2224, 2013.

CAMPANELLI, A. P.; ROSELINO, A. M.; CAVASSANI, K. A.; PEREIRA, M. S. F.; MORTARA, R. A.; BRODSKYN, C. I.; GONCALVES, H. S.; BELKAID, Y.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; SILVA, J. CD4+ CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. **J. Infect. Dis.**, v. 193, p. 1313-1322, 2006.

CARVALHO, L. P.; PASSOS, S. T.; JESUS, A. R. Imunopatogênese da Leishmaniose Tegumentar. **Gazeta Méd. da Bahia**, v. 75, n. 1, p. 57-65, 2005.

CECÍLIO, P.; PÉREZ-CABEZAS, B.; SANTARÉM, N.; RODRIGUES, V.; DA SILVA, A. C. Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite. **Front. in Immun.**, v. 5, n. 480, p. 1-16, 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Disponível em <<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>. Acesso em: 10 ago 2014.

CHAN-BACAB, M. J.; PENÑ-RODRIGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Nat. Prod. Rep.**, v. 18, n. 6, p. 674-688, 2001.

CHAARA, D.; HAOUAS, N.; DEDET, J. P.; BABBA, H.; PRATLONG, F. Leishmaniasis in Maghreb: An endemic neglected disease. **Revista Acta. Trop.**, v. 132, p. 80-93, 2014.

CHEN, J.; VISTICA, B. P.; TAKASE, H.; HAM, D. I.; FARISS, R. N.; WAWROUSEK, E. F.; CHAN, C. C.; DEMARTINO, J. A.; FARBER, J. M.; GERY, I. A unique pattern of up- and downregulation of chemokine receptor CXCR3 on inflammation-inducing Th1 cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 34, n. 10, p. 2885-2894, 2004.

CHARO, I. F.; RANSOHOFF, R. M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. **N. Engl. J. Med.**, v. 9, p. 610-621, 2006.

CHILDS, G. E.; LIGHTNER, L.; MCKINNEY, M. G.; GROVES, E. E.; PROICE, L. D.; HENDRICK, I. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana* and *L. aethiopica*. **Annals of Trop. Med. and Parasito.**, v. 78, p. 25-34, 1984.

COLVIN, R. A.; CAMPANELLA, G. S. V.; SUN, J.; LUSTER, A. D. Intracellular Domains of CXCR3 That Mediate CXCL9, CXCL10, and CXCL11 Function. **The Jour. of Biolo. Chem.**, v. 279, n. 29, p. 30219-30227, 2004.

COSTA, D. L.; CARREGARO, V.; LIMA-JÚNIOR, D. S.; SILVA, N. M.; MILANEZI, C. M.; CARDOSO, C. R.; GIUDICE, A.; DE JESUS, A. R.; CARVALHO, E. M.; ALMEIDA, R. P.; SILVA, J. S. BALB/c mice infected with antimony treatment refractory isolate of *Leishmania braziliensis* present severe lesions due to IL-4 production. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 5, n. 3, p. 965, 2011.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clini. Microbiol.**, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

DA-CRUZ, A. M.; BITTAR, R.; MATTOS, M.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; NOGUEIRA, R.; PINHO-RIBEIRO, V.; AZEREDO-COUTINHO, R. B.; COUTINHO, S. G. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. **Clinical and Diagn. Labora. Immune.**, v. 9, n. 2, p. 251-256, 2002.

DA SILVA SANTOS, C.; BRODSKYN, C. I. The role of CD4+ and CD8+ T cells in human cutaneous leishmaniasis. **Front. in Public Heal.**, v. 2, n. 165, p. 1-6, 2014.

DE MOURA, T. R.; NOVAIS, F. O.; OLIVEIRA, F.; CLARENCIO, J.; NORONHA, A.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C.; DE OLIVEIRA, C. I. Towards a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infect. and Immun.**, v. 73, n. 9, p. 5827-5834, 2005.

DE MOURA, T. R.; OLIVEIRA, F.; NOVAIS, F. O.; MIRANDA, J. C.; CLARÊNCIO, J.; FOLLADOR, I.; CARVALHO, E. M.; VALENZUELA, J. G.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C.; DE OLIVEIRA, C. I. Enhanced *Leishmania braziliensis* Infection Following Pre-Exposure to Sandfly Saliva. **PLoS Neglec. Trop. Disea.**, v. 1, n. 2, p. 84, 2007.

DE OLIVEIRA, C. I., TEIXEIRA, M. J., TEIXEIRA, C. R., DE JESUS, J. R., ROSATO, A. B., DA SILVA, J. S., BRODSKYN, C., BARRAL-NETTO, M., BARRAL, A. *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. **Micro. and Infect.**, v. 6, p. 977-984, 2004.

DE OLIVEIRA, C. I.; BRODSKYN, C. I. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. **Front. in Immun.**, v. 3, n. 145, p. 1-9, 2012.

DEKREY, G. K.; LIMA, H. C.; TITUS, R. G. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. **Infect. and Immun.**, v. 66, n. 2, p. 827-829, 1998.

DÍAZ, N. L.; ZERPA, O.; TAPIA, F. J. Chemokines and chemokine receptors expression in the lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 4, p. 446-452, 2013.

DUFOUR, J. H.; DZIEJMAN, M.; LIU, M. T.; LEUNG, J. H.; LANE, T. E.; LUSTER, A. D. IFN- γ -inducible protein 10 (CXCL10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for CXCL10 in effector T cell generation and trafficking. **The Jour. of Immun.**, v. 168, p. 3195-3204, 2002.

FALCÃO, C. S.; DE MOURA, T. R.; CLARÊNCIO, J.; BRODSKYN, C.; BARRAL, A.; DE OLIVEIRA, C. I. The presence of Tregs does not preclude immunity to reinfection with *Leishmania braziliensis*. **Int. J. Parasitol.** v. 42, n. 8, p. 771-780, 2012.

FARIAS, L. H. S.; RODRIGUES, A. P. D.; SILVEIRA, F. T.; SEABRA, S. H.; DA MATTA, R. A.; SARAIVA, E. M.; SILVA, E. O. Phosphatidylserine Exposure and Surface Sugars in Two *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Strains Involved in Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Jour. of Infect. Disea.**, v. 10, p. 1-7, 2012.

FOLLADOR, I.; ARAUJO, C.; BACELLAR, O.; ARAUJO, C. B.; CARVALHO, L. P.; ALMEIDA, R. P.; CARVALHO, E. M. Epidemiologic and immunologic findings for the

subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. **Clini. Infect. Disea.**, v. 34, p. e54-e58, 2002.

FOWELL, D. J. Signals for the execution of Th2 effector function. **Natio. Instit. of Healt.**, v. 46, n.1, p. 1-6, 2009.

GHALIB, H. W.; WHITTLE, J. A.; KUBIN, M.; HASHIM, F. A.; EL-HASSAN, A. M.; GRABSTEIN, K. H.; TRINCHIERI, G.; REED, S. G. IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. **The Jour. of Immun.**, v.154, p.4623-4629, 1995.

GIUDICE, A.; CAMADA, I.; LEOPOLDO, P. TG.; PEREIRA, J. MB.; RILEY, L. W.; WILSON, M. E.; HO, J. L.; DE JESUS, A. R.; CARVALHO, E. M.; ALMEIDA, R. P. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BMC Infect. Disea.**, p. 2-12, 2007.

GOTO, H.; PRIANT, M. G. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. **Revista Instit. de Med. Trop.**, v. 51, n. 5, p. 241-246, 2009.

GUERRA, P. V.; TEIXEIRA, M. J. Efeito protetor de CXCL10 em camundongos BALB/C infectados com *Leishmania braziliensis*. **Dissertação da Universidade Federal do Ceará**, 2013.

GUPTA, G.; BHATTACHARJEE, S.; BHATTACHARYYA, S.; BHATTACHARYA, P.; ADHIKARI, A.; MUKHERJEE, A.; MAJUNDAR, S. B.; MAJUMDAR, S. CXC chemokine-mediated protection against Visceral Leishmaniasis: Involvement of the Proinflammatory Response. **The Jour. of Infect. Disea.**, v. 200, p. 1300-1310, 2009.

HARHAY, M. O.; OLLIARO, P. L.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Tre. in Parasit.** v. 27, n. 9, p. 403-409, 2011.

HOLZMULLER, P.; HIDE, M.; SERENO, D.; LEMESRE, JL. *Leishmania infantum* amastigotes resistant to nitric oxide cytotoxicity: Impact on in vitro parasite developmental cycle and metabolic enzyme activities. **Infect. Genet. and Evolu.**, v. 6, p. 187-197, 2005.

INIESTA, V.; GOMEZ-NIETO, L. C.; CORRALIZA, I. The inhibition of arginase by *N*(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. **The Jour. of Experimen. Med.**; v.193, p.777-784, 2001.

JUNIOR, G. G.; MORIEARTY, P. L. Host factors influencing outcome of *Leishmania mexicana Mexicana* infection in mice. **Memó. do Instit. Oswa. Cruz**, v. 78, n. 1, p. 49-59, 1983.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **The Jour. of Immun.**, v. 166, p. 1141-1147, 2001.

KÉBAIER, C.; LOUZIR, H.; SALAH, A. B.; DELLAGI, A. K. Heterogeneity of Wild *Leishmania major* Isolates in Experimental Murine Pathogenicity and Specific Immune Response. **Infec. and Immun.**, v. 69, n. 8, p. 4906-4915, 2001.

KIMBLIN, N.; PETERS, N.; DEBRABANT, A.; SECUNDINO, N.; EGEN, J.; LAWYER, P.; FAY, M. P.; KAMHAWI, S.; SACKS, D. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. **Revista Med. Scien.**, v. 105, n. 29, p. 10125-10130, 2008.

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. IL-17 and Th17 Cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 27, p. 485-517, 2009.

LAUNOIS, P.; GUMY, A.; HIMMELRICH, H.; LOCKSLEY, R. M.; ROCKEN, M.; LOUIS, J. A. Rapid IL-4 Production by *Leishmania* Homolog of Mammalian RACK1-Reactive CD4+ T Cells in Resistant Mice Treated Once with Anti-IL-12 or -IFN- γ Antibodies at the Onset of Infection with *Leishmania major* Instructs Th2 Cell Development, Resulting in Nonhealing Lesions. **The Jour. of Immun.**, v. 168, p. 4628-4635, 2002.

LLANOS-CUENTAS, A. *et al.* Clinical and Parasite Species Risk Factors for Pentavalent Antimonial Treatment Failure in Cutaneous Leishmaniasis in Peru. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, n. 2, p. 223-231, 2008.

LEE, E. Y.; LEE, Z. H.; SONG, Y. W. CXCL10 and autoimmune diseases. **Autoimmu. Reviews**, v. 8, p. 379-383, 2009.

LIEW, F.Y., COX, F. E. Non-specific defence mechanism: the role of nitric oxide. **Immunol. Today**, v. 12, p. 17-21, 1991.

LIMA, H. C.; DEKREY, G. K.; TITUS, R. G. Resolution of an infection with *Leishmania braziliensis* confers complete protection to a subsequent challenge with *Leishmania major* in BALB/c mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 94, n. 1, p. 71-76, 1999.

LIU, L.; CALLAHAN, M. K.; HUANG, D.; RANSOHOFF, R. M. Chemokine receptor CXCR3: an unexpected enigma. **Curr. Top. Dev. Biol.**, v. 68, p. 149-181, 2005.

LIU, M.; GUO, S.; HIBBERT, J. M.; JAIN, V.; SINGH, N.; WILSON, N. O.; STILES, J. K. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. **Rev. Cyt. Growth F.**, v. 22, n. 3, p. 121-130, 2011.

LORÍA-CERVERA, E. N.; ANDRADE-NARVÁEZ, F. J. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. **Revis. Instit. de Med. Trop.**, v. 56, n. 1, p. 1-11, 2014.

MAILLARD, I.; LAUNOIS, P.; HIMMELRICH, H.; ACHA-ORBEA, H.; DIGGELMANN, H.; LOCKSLEY, R. M.; LOUIS, J. A. Functional plasticity of the LACK-reactive V I 4-V > 8 CD4+ T cells normally producing the early IL-4 instructing Th2 cell development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. **European Journ. Immun.**, v. 31, p. 1288-1296, 2001.

MAJUMDER, S.; BHATTACHARJEE, S.; CHOWDHURY, B. P.; MAJUMDAR, S. CXCL10 Is Critical for the Generation of Protective CD8 T Cell Response Induced by Antigen Pulsed CpG-ODN Activated Dendritic Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e48727, 2012.

MALLA, N.; MAHAJAN, R. C.; Pathophysiology of visceral leishmaniasis - some recent concepts. **Indian Jour. of Med. Resea.**, v. 123, p. 267-274, 2006.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **An Internac. Jour. of Med. (QJM)**, v. 107, p. 7-14, 2013.

MEDDEB-GARNAOUI, A.; ZRELLI, H.; DELLAGI, K. Effects of tropism and virulence of *Leishmania* parasites on cytokine production by infected human monocytes. **Clin. and Experim. Immun.**, v. 155, p. 199-206, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/MS. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2ª edição. **Portal da Saúde**. Brasília, 2013. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf> Acesso em: 14 out 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/MS. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana: Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2011. **Portal da Saúde**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2014_11_casos_de_lta_entre_1990_e_2013.pdf>. Acesso em: 3 nov 2014.

MOHAN, K.; CORDEIRO, E.; VACI, M.; MCMASTER, C.; ISSEKUTZ, T. B. CXCR3 is required for migration to dermal inflammation by normal and in vivo activated T cells: differential requirements by CD4 and CD8 memory subsets. **Europe. Jour. of Immun.**, v. 35, p.1702-1711, 2005.

MOLL, H.; FLOHE, S.; BLANK, C. Dendritic cells seclude *Leishmania* parasites that persist in cured mice – a role in the maintenance of T-cell memory? **Adv. Exp. Med. Biol.**, n. 378, p. 507-509, 1995.

MOSER, B.; WOLF, M.; WALZ, A.; LOETSCHER, P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. **Tren. in Immun.**, v. 25, p. 75-84, 2004.

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, v. 136, n. 7, p. 2348-2357, 1986.

MUKHOPADHYAY, R.; MUKHERJEE, S.; MUKHERJEE, B.; NASKAR, K.; MONDAL, D.; DECUYPERE, S.; OSTYN, B.; PRAJAPATI, V. K.; SUNDAR, S.; DUJARDIN, J. C.; ROY, S. Characterisation of antimony-resistant *Leishmania donovani* isolates: Biochemical and biophysical studies and interaction with host cells. **Internatio. Jour. for Parasit**, v. 41, p. 1311-1321, 2011.

MULLER, K.; VAN ZANDBERGEN, G.; HANSEN, B.; LAUFS, H.; JAHNKE, N.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Med. Microbio. and Immun.**, v. 90, p. 73-76, 2001.

MURRAY, H.W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. **Int J Exp Pathol**. v. 82, n.5, p. 249-67, 2001.

MURDOCH, C.; FINN, A. Chemokines receptors and their role in inflammation and infectious diseases. **The Americ. Socie. of Hemato.**, v. 95, p. 1302-1312, 2000.

NEAL, R. A.; HALE, C. A comparative study of susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World cutaneous Leishmaniasis. **The Jour. of Parasit.**, v. 87, p. 7-13, 1983.

NIETO, A.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; ORDEN, J.A.; DE LA FUENTE, R.; MADRID-ELENA, N.; CARRIÓN, J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. **Vet Res.**, v. 23, n. 42, p.1-39, 2011.

NOVAIS, F. O.; SANTIAGO, R. C.; BAFICA, A.; KHOURI, R.; AFONSO, L.; BORGES, V. M.; BRODSKYN, C.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; DEOLIVEIRA, C. I. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. **The Jour. of Immun.**, v.183, p. 8088-8098, 2009.

NYLEN, S.; MAURYA, R.; EIDSMO, L.; MANANDHAR, K. D.; SUNDAR, S.; SACKS, D. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **The Jour. of Experimen. Med.**, v.204, p.805–817, 2007.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; SMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resist Updat.**, v. 7, p. 257-266, 2004.

OGHUMU, S.; LEZAMA-DÁVILA, C. M.; ISAAC-MÁRQUEZ, A. P.; SATOSKAR, A. R. Role of chemokines in regulation of immunity against leishmaniasis. **Experim. Parasit.**, v. 126, p. 389-396, 2010.

PACE, D. Leishmaniasis. **Jour. of Infect.**, v. 69, p. 10-18, 2014.

PEREIRA, A. B.; REZENDE, N. A.; JUNIOR, A. L. T.; TEIXEIRA, M. M.; SILVA, A. C. S. Citocinas e quimiocinas no transplante renal. **Jorn. Brasil. de Nefrol.**, v. 31, n. 4, p. 286-296, 2009.

PIGOTT, D. M.; *et al.* Global Distribution Maps of the Leishmaniasis. **eLife**, v. 3, p. e02851, 2014.

PIRMEZ, C.; COOPER, C.; PAES-OLIVEIRA, M.; SCHUBACH, A.; TORIGIAN, V. K.; MODLIN, R. L. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. **J. Immunol.**, v. 145, p. 3100-3104, 1990.

PISCOPO, T. V.; Azzopardi, C. M. Leishmaniasis. **Postgrad. Med. J.**, v. 82, p. 649-657, 2006.

QADOUMI, M.; BECKER, I.; DONHAUSER, N.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Skin Lesions of Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. **Infect. and Immun.**, v. 70, n. 8, p. 4638-4642, 2002.

RIBEIRO-GOMES, F. *et al.* Macrophage Interactions with Neutrophils Regulate *Leishmania major* Infection. **The Jour. of Immun.**, v. 172, p. 4454-4462, 2004.

RITTER, U.; MOLL, H. Monocyte chemotactic protein-1 stimulates the killing of *Leishmania major* by human monocytes, acts synergistically with IFN-gamma and is antagonized by IL-4. **European Jour. of Immun.**, v. 30, p. 3111-3120, 2000.

RITTER, U.; MOLL, H.; LASKAY, T.; BROCKER, E.; VELAZCO, O.; BECKER, I.; GILLITZER, R. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. **The Jour. of Infect. Disea.**, v.173, p. 699-709, 1996.

RITTER, U.; KORNER, H. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. **Paras. Immun.**, v. 24, p. 295-301, 2002.

ROCHA, F. J. S.; SCHLEICHER, U.; MATTNER, J.; ALBER, G.; BOGDAN, C. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 8, p. 3823-3832, 2007.

ROLLINS, B.; J. Chemokines. **Blo. Jour.**, v. 90, p. 909-928, 1997.

ROSAS, L. E.; BARBI, J.; LU, B.; FUJIWARA, Y.; GERARD, C.; SANDERS, V. M.; SATOSKAR, A. R. CXCR3^{-/-} mice mount an efficient Th1 response but fail to control *Leishmania major* infection. **European Jour. of Immun.**, v. 35, n. 2, p. 515-523, 2005.

ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annual Revi. of Immuno.**, v. 18, p. 217-242, 2000.

ROT, A.; VON ANDRIAN, U. H. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. **Annual Revi. of Immun.**, v. 22, p. 891-928, 2004.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat. Rev.**, v. 2, p. 845-858, 2002.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nat. Publis. Group (npg)**, v. 3, n. 11, p. 1041-1047, 2002.

SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; COFFMAN, R. L.; PEARCE, E.; SHER, A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. **J. Exp. Med.**, v. 168, p. 1675-1684, 1988.

SERBINA, N. V. T.; JIA, T. M.; HOHL, E. G. PAMER. Monocyte mediated defense against microbial pathogens. **Annual Revi. of Immun.**, v. 26, p. 421-452, 2008.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. EP. Clinical and immunopathological spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A Review. **Mem. do Instit. Oswa. Cruz**, v. 93, n. 3, p. 239-251, 2004.

SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell. Press**, v. 76, p. 301-314, 1994.

SOUSA, A. Q.; POMPEU, M. M.; SÓLON, F. R.; FRUTUOSO, M. S.; TEIXEIRA, M. J.; SILVA, T. M. Disseminated cutaneous leishmaniasis: a patient with 749 lesions. **Braz J. Infect. Dis.**, n. 10, v. 3, p. 230, 2006.

SOUZA, A. S.; GIUDICE, A.; PEREIRA, J. M. B.; GUIMARÃES, L. H.; DE JESUS, A. R.; DE MOURA, T. R.; WILSON, M. E.; CARVALHO, E. M.; ALMEIDA, R. P. Resistance of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF- α production. **BMC Infect. Dis.**, v. 10, n. 209, p. 1-11, 2010.

TALAAT, R. M.; MOHAMED, S. F.; BASSYOUNI, I. H.; RAOUF, A. A. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity. **Else.**, v. 72, p. 146-153, 2015.

TASWELL, C. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies III. Validity tests for the single-hit Poisson model. **J. Immunol. Meth.**, v. 72, p. 29-40, 1984.

TEIXEIRA, M. J.; TEIXEIRA, L. R.; ANDRADE, B. B.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. **Tren. in Parasit.**, v. 22, n. 1, p. 32-40, 2006.

TEIXEIRA, M. J.; FERNANDES, J. D.; TEIXEIRA, C. R.; ANDRADE, B. B.; POMPEU, M. L.; DA SILVA, S. J.; BRODSKYN, C. I.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. **Infect. and Immun.**, v. 73, n. 2, p. 1191-1195, 2005.

THELEN, M. Dancing to the tune of chemokines. **Nat. Immun.**, v. 2, p. 129-134, 2001.

TITUS, R.G., CEREDIG, R.; CEROTTINI, J. C.; LOUIS, J. A. Therapeutic effect of anti-L3T4 monoclonal antibody GK 1.5 on cutaneous leishmaniasis in genetically – susceptible BALB/c mice. **The Jour. of Immuno.**, v.135, p. 2108-2114, 1985.

TRINCHIERI, G.; GEROSA, F. Immunoregulation by interleukin 12. **Journ. of Leuko. Biolo.**, v. 59, p. 505-511, 1996.

TULADHAR, R.; NATARAJAN, G.; SATOSKAR, A. R. Role of Co-stimulation in Leishmaniasis. **Revista Internatio. Jour. of Biolog. Sci.**, v. 7, n. 9, p. 1382-1390, 2011.

VAN ASSCHE, T.; DESCHACHT, M.; DA LUZ, R. A.; MAES, L.; COS, P. *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. **Free Radic. Biolo. & Medic.**, v. 51, n. 2, p. 337-51, 2011

VAN ZANDBERGEN, G.; *et al.* Cutting Edge: Neutrophil granulocytes serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **The Jour. of Immun.**, v. 173, p. 6521-6525, 2004.

VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A.; XIN, L.; SOONG, L. *Leishmania braziliensis* infection induces dendritic cell activation, ISG15 transcription, and the generation of protective immune responses. **The Jour. of Immun.**, v. 180, n. 11, p. 7537-7545, 2009.

VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A.; HOGG, A. E.; TULLIANO, G.; LLANOS-CUENTAS, A.; AREVALO, J.; ENDSLEY, J. J.; SOONG, L. CXCL10 production by human monocytes in response to *Leishmania braziliensis* infection. **Infect. and Immun.**, v. 78, n. 1, p. 301-308, 2010.

VASCONCELOS, I. A.; VASCONCELOS, A. W.; MOMEN, H.; GRIMALDI, G. J. R.; ALENCAR, J. E. Epidemiological studies on American leishmaniasis in Ceara State, Brazil- Molecular characterization of the *Leishmania* isolates. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** v. 82, p. 547-554, 1988.

VASQUEZ, R. E.; SOONG, L. CXCL10/gamma interferon-inducible protein 10-mediated protection against *Leishmania amazonensis* infection in mice. **Infect. and Immun.**, v. 74, n. 12, p. 6769-6777, 2006.

VIEIRA-GONÇALVES, R.; NOGUEIRA, R. S.; HERINGER, J. F.; MENDES-AGUIAR, C. O.; GOMES-SILVA, A.; SANTOS-OLIVEIRA, J. R.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; DA-CRUZ, A. M. Clinical and immunologic evidence that low doses of pentavalent antimonial are effective in maintaining a long-term cure of *Leishmania* (Vianna) *braziliensis* cutaneous lesions. **Brit. Jour. of Dermat.**, 2015.

VESTER, B.; MULLER, K.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Early gene expression of NK cell-activating chemokines in mice resistant to *Leishmania major*. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 6, p. 3155-3159, 1999.

VON STEBUT, E. Cutaneous *Leishmania* infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. **Experim. Dermat.**, v. 16, n. 4, p. 340-346, 2007.

WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Revista Sau. Públi.**, v. 48, n. 5, p. 851-855, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO/OMS. Control of the leishmaniasis. WHO Technical Report Series. Geneva, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO/OMS. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 10 ago 2014.

WOELBING, F.; KOSTKA, S. L. ; MOELLE, K.; BELKAID, Y.; SUNDERKOETTER, C.; VERBEEK, S.; WAISMAN, A.; NIGG, A. P.; KNOP, J.; UDEY, M. C.; STEBUT, E. V. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fc γ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. **The Jour. of Experim. Medic.**, v. 203, n. 1, p. 177-188, 2006.

APÊNDICE I

Tabela 1 – Avaliação da histopatologia de lesão de orelha de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* resistente ao antimônio e tratados com CXCL10. **Primeira semana** após tratamento.

	Exsudato Inflamatório	Granuloma	Parasitismo	Necrose	Macrófago Ativado	Linfócito	Eosinófilo	Célula Gigante	Neutrófilo	Plasmócito	Fibrose
CT1	1	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0
CT2	3	1	3	0	1	1	1	0	0	1	0
CT3	3	0	3	0	1	1	1	0	0	0	0
CT4	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0
GLU1	3	0	3	1	2	1	2	0	1	1	0
GLU2	1	0	2	0	1	1	1	0	0	1	0
GLU3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CX1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0
CX2	3	1	3	0	3	1	1	0	1	1	0
CX3	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
CX4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CX+GLU1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CX+GLU2	2	0	2	0	1	1	2	0	1	1	0
CX+GLU3	2	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1
CX+GLU4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Cada parâmetro foi avaliado por um único observador segundo presença ou ausência do evento através de escores: 0 (ausência), 1 (presença de 1-25%), 2 (presença de 25-50%) e 3 (>50%). Patas de animais sadios foram utilizadas como controle negativo. CT=Controle, GLU=Glucantime, CX=CXCL10 e CX+GLU=CXCL10+Glucantime.

APÊNDICE II

Tabela 2 – Avaliação da histopatologia de lesão de orelha de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* resistente ao antimônio e tratados com CXCL10. **Terceira semana** após tratamento.

	Exsudato Inflamatório	Granuloma	Parasitismo	Necrose	Macrófago ativado	Linfócito	Eosinófilo	Célula Gigante	Neutrófilo	Plasmócito	Fibrose
CT1	3	0	2	1	1	1	2	0	1	1	0
CT2	3	0	3	1	1	1	1	0	2	0	0
CT3	1	1	1	0	1	1	2	0	1	0	0
CT4	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1
GLU1	2	0	2	0	1	1	1	0	2	0	0
GLU2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
GLU3	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
GLU4	2	0	0	0	1	1	2	1	1	1	0
CX1	1	0	0	0	2	2	1	0	1	0	0
CX2	1	1	1	0	2	2	1	1	1	1	0
CX3	1	1	1	0	2	1	0	0	1	0	0
CX4	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
CX5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
CX+GLU 1	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0
CX+GLU 2	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0

CX+GLU	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
3											

Cada parâmetro foi avaliado por um único observador segundo presença ou ausência do evento através de escores: 0 (ausência), 1 (presença de 1-25%), 2 (presença de 25-50%) e 3 (>50%). Patas de animais sadios foram utilizadas como controle negativo. CT=Controle, GLU=Glucantime, CX=CXCL10 e CX+GLU=CXCL10+Glucantime.

ANEXO I

ANEXO 1 - Declaração de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal.



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 78/2013, sobre o projeto intitulado: **"EFEITO DE CXCL10 EM CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM CEPA DE LEISHMANIA BRAZILIENSISREFRATÁRIA AO ANTIMÔNIO"**, de responsabilidade da Profa. Dra. Maria Jania Teixeira e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 16 de maio de 2014.

Fortaleza, 16 de maio de 2014


Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

Prof. Dra. Nylane M. Nunes de Alencar
Coordenadora da CEPA/DIFF/IFAM/UEFC
MAT. SIAPE 2166369